

ANNÉE 1957

THÈSE

706
N°

POUR LE

DOCTORAT EN MÉDECINE

(Diplôme d'État)

PAR

Pierre René Léon SOUDET

né à Paris le 6 juin 1927

Présentée et soutenue publiquement le

1957

LE CONTRASTE DE PHASE

données générales

concernant son application en microscopie biologique

Président : M. STROHL

C.I.B.

4, RUE DU BOULOI, PARIS

1957

FACULTÉ DE MÉDECINE DE PARIS

ANNÉE 1957

THÈSE

N°

POUR LE

DOCTORAT EN MÉDECINE

(Diplôme d'État)

PAR

Pierre René Léon SOUDET

né à Paris le 6 juin 1927

Présentée et soutenue publiquement le

1957

LE CONTRASTE DE PHASE

données générales

concernant son application en microscopie biologique

Président : M. STROHL

C.I.B.

4, RUE DU BOULOI, PARIS

1957

PROFESSEURS HONORAIRES :

MM. Baudouin, Bénard (H.), Brocq (P.), Cadenat, Carnot, Charol, Champy, Chevassu, Debré (R.), Delbet, Donzelot, Gastinel, Guillaïn, Halphen, Harvier, Laroche (G.), Laubry, Lemaître, Lévy-Solal, Lhermitte, Lian, Loeper, Marion, Mathieu, Mocquot, Mondor, Mulon, Olivier (E.), Richet (Ch.), Sannié, Sézary, Tanon, Velter.

DOYEN Léon BINET.

Membre de l'Institut

ASSESEUR Jean VERNE.

I. — PROFESSEURS

	MM.
Anatomie	CORDIER (G.)
Anatomie pathologique	DELARUE (A.)
Bactériologie	FASQUELLE (R.)
Biologie appliquée à l'Education physique et aux Sports	CHAILLEY-BERT (P.)
Biologie médicale	FAUVERT (R.)
Cancérologie médicale et sociale	JEAN-BERNARD
Chimie médicale	JAYLE (M. F.)
	Hôtel-Dieu MÈNÉGAUX
Cliniques chirurgicales	Beaujon SICARD (A.)
	Salpêtrière MOULONGUET (P.)
	Cochin QUÉNU (J.)
Clinique chirurgicale réparatrice et Orthopédique	MERLE D'AUBIGNÉ (R.)
Clinique de cardiologie	MOUQUIN (M.)
Clinique de chirurgie cardio-vasculaire	de GAUDART-D'ALLAINES
Clinique de chirurgie infantile et d'orthopédie	FÈVRE (M.)
Clinique de chirurgie pleuro-pulmonaire	MONOD (R.)
Clinique de la tuberculose	BERNARD (E.)
Clinique de neuro-chirurgie	PETIT-DUTAILLIS (D.)
Clinique de puériculture	LELONG (M.)
Clinique des maladies cutanées et syphilitiques	DEGOS (R.)
Clinique des maladies du sang	CHEVALLIER (P.)
Clinique des maladies du système nerveux	ALAJOUANINE (T.)
Clinique des maladies des enfants	CATHALA
Clinique des maladies infectieuses	MOLLARET (P.)
Clinique des maladies mentales et de l'encéphale	DELAY (J.)
Clinique gynécologique	FUNK-BRENTANO (P.)
	Hôtel-Dieu BARIÉTY (M.)
Cliniques médicales	Bichat JUSTIN-BESANÇON
	Cochin MOREAU (R.)
	Broussais DE GENNES (L.)
Clinique médicale d'Hydro-climatologie thérapeutique	DEBRAY
Clinique médicale propédeutique	PASTEUR VALLERY-RADOT (L.)
Clinique médico-sociale du diabète sucré et des maladies de la nutrition	BOULIN (R.)
	Tarnier LANTUEJOUL (P.)
Cliniques obstétricales	Baudelocque LACOMME (M.)
	Port-Royal VARANGOT
Clinique ophtalmologique	RENARD
Clinique oto-rhino-laryngologique	AUBIN (A.)
Clinique physio-pathologique des problèmes alimentaires	HAMBERGER
Clinique psychiatrique infantile	HEUYER (C.)
Clinique rhumatologique et sociale	COSTE (F.)
Clinique stomatologique	DECHAUME (M.)
Clinique thérapeutique chirurgicale	SÈNÈQUE (J.)
Clinique thérapeutique médicale	LEMAIRE (A.)
Clinique urologique	FEY (B.)
Embryologie	GIROUD (A.)
Génétique médicale	LAMY (M.)
Histoire de la médecine et de la chirurgie	SOULIÉ
Histologie	VERNE (J.)

Hygiène et clinique de la première enfance	TURPIN
Hygiène et médecine préventive	JOANNON (C.)
Médecine du Travail	DESOILLE (H.)
Médecine légale	PIÉDELIEVRE (R.)
Parasitologie et histoire naturelle médicale	GALLIARD (H.)
Pathologie chirurgicale	N.
Pathologie exotique	LAVIER (G.)
Pathologie expérimentale et comparée	LENÈGRE (J.)
Pathologie humorale et immunologie expérimentale (chaire à titre personnel)	MERKLEN (F. P.)
Pathologie médicale	DECOURT
Pathologie et thérapeutique générales	GARCIN (J.)
Pédiatrie sociale	MARIE (J.)
Pharmacologie et matière médicale	HAZARD (R.)
Physico-chimie médicale (Chaire à titre personnel)	DOGNON (A.)
Physiologie	BINET (L.)
Physique médicale	STROHL (A.)
Radiologie médicale	DESGREZ (H.)
Technique chirurgicale	PATEL
Thérapeutique	N.

II. — PROFESSEURS SANS CHAIRE MAITRES DE CONFÉRENCES-AGRÉGÉS ET AGRÉGÉS

MM.

Anatomie	DELMAS (A.), pr. s. ch. DEBEYRE (J.) OLIVIER () CABROL (C.)
Anatomie pathologique	CAUTHIER-VILLARD (Mlle P.) pr. s. ch. BUSSET (F.) GOUYGOU (Ch.)
Bactériologie	NÉVOT (A.) CHRISTOL (D.)
Biochimie médicale	ETTORI (J.), pr. s. ch. N. . . . N. . . .
Biologie médicale	BOURLIÈRE (F.)
Dermato-Syphiligraphie	DUPERRAT (F.)
Embryologie	TUCHMANN
Histologie	N. . . . N. . . . N. . . .
Hydrologie	CORNET
Hygiène	BOYER (J.), pr. s. ch. DEPARIS (M.), pr. s. ch.
Maladies infectieuses	BASTIN
Médecine légale et du travail	DEROBERT (L.), pr. s. ch. GAULTIER (M.) HADENGUE (A.) ALBAHARY
Neurochirurgie	DAVID (M.)
Neurologie	LHERMITTE
Obstétrique	GRASSET (J.) LEPAGE (F.) MERGER (R.) MORIN (P.) RAVINA (J.) ROBEY (M.) LE LORIER
Ophthalmologie	DESIGNES (P.) BRÉGEAT
Orthopédie	JUDET (R.)
Oto-rhino-laryngologie	AUBRY (M.) MADURO (R.)
Parasitologie	CHABAUD (A.) N. . . .
Pathologie chirurgicale	ABOULKER (P.) BAUMANN (J.) GOSSET (J.) LAURENCE (G.)

MM.

Pathologie chirurgicale	LORTAT-JACOB (J.) OLIVIER (Cl.) POILLEUX (F.) VERNE (J. M.) DUBOST MATHEY FLABEAU CAUCHOIX FAUREL BARCAT GERMAIN THOMERET
Pathologie expérimentale	LÉPER (M.) MAURICE BOUDIN (G.) CASTAIGNE (P.) CONTE (M.) DOMART (A.) LAMOTTE (M.) LAROUCHE (Cl.) MILLIEZ (P.) PÉQUIGNOT (H.) PERRAULT (M.) RAMBERT (P.) THIEFFRY (St.) TURIAF (J.) BRICAIRE ROYER BRISAUD DEROT BOUVIER MACREZ WOLFROMM
Pathologie médicale	JOSEPH (R.) MOZZICCONACCI (P.) POLONOVSKY (Cl.)
Pédiatrie	CHEYMOL (J.), pr. s. ch. LEVY (Mlle J.), pr. s. ch. BARJETON (D.), pr. s. ch. PARROT (J.), pr. s. ch. DEJOURS (P.)
Pharmacologie	DJOURVO (A.), pr. s. ch. GOUGEROT (L.)
Physiologie	KREIS (B.) PICHOT
Physique médicale	Psychiatrie Psychiatrie infantile Rhumatologie
Pneumo-Phthisiologie	MICHAUX (Z.) DELBARRE
Stomatologie	CHAPUT (Mme A.) CERNÉA (P.)
Thérapeutique	CHASSAGNE
Urologie	KUSS (R.)

III. — PROFESSEURS SANS CHAIRE ET AGRÉGÉS CHARGÉS DE COURS DE CLINIQUE ANNEXE

à titre permanent.

	MM.		MM.	
Clinique chirurgicale . . .	{	AMELINE (A.)	{	HAGUENAU (M.), pr. s. ch.
		HUGUIER (J.)		KOURILSKY (R.)
		LÉGER (L.)		MARCHAL (G.)
		PADOVANI (P.)		
		ROUX (M.)		
		RUDLER (J. C.)		
Clinique médicale. . . .	{	BROUET (G.)	{	EGALLE (G.)
		N...		MAYER (M.)
		DREYFUS (Gilbert)		
			Clinique ophtalmologique .	OFFRET (G.)
			Clinique urologique. . . .	COUVELAIRE (R.)

Secrétaire général de la Faculté. M. MOREL (J.)
Secrétaire Mlle CHAINTREUIL (G.)

Conservateur, chargé de la direction	M. le Docteur HAHN (A.)
Conservateur	Mlle GOICHON
Bibliothécaires	Mlles DUMAITRE (P.), LAURENT (H.), LE NOIR (G.), QUIÉVREUX (E.)

A mes Parents,
à ma famille.



Digitized by the Internet Archive
in 2026

A monsieur le Professeur A. STROHL,
Professeur à la Faculté de Médecine de Paris
qui a bien voulu nous faire l'honneur
de présider cette thèse.

A la mémoire du Professeur R. LEROUX,
Professeur à la Faculté de Médecine de Paris

A monsieur le Professeur Agrégé KOURILSKY,
En témoignage de notre gratitude
et de notre profond attachement.

A monsieur le Professeur J. PATEL,
Professeur à la Faculté de Médecine de Paris

A monsieur le Professeur Agrégé J. BAUMANN,
Chirurgien des Hôpitaux

A monsieur le Docteur H. BROCARD,
Médecin des Hôpitaux

A mes Maîtres dans les Hôpitaux.

A monsieur le Professeur J. DELARUE,
Professeur à la Faculté de Médecine de Paris

A mademoiselle le Professeur P. GAUTHIER-VILLARS,
Professeur sans chaire à la Faculté de Médecine de Paris

A monsieur le Professeur F. BUSSE,
Professeur Agrégé à la Faculté de Médecine de Paris

A monsieur le Professeur Ag. GUYOU,
Professeur Agrégé à la Faculté de Médecine de Paris

A mes Maîtres de la Faculté de Médecine.

A mes Maîtres de l'Institut Pasteur :

Monsieur le Docteur J. DUMAS,

Chef de Service

Monsieur le Docteur THIBAUT.

Monsieur P. MANIGAULT,

Docteur ès Sciences

A mes Maîtres des Facultés des Sciences :

Monsieur le Professeur A.M. MONNIER,
Professeur à la Sorbonne

Monsieur le Professeur A. SOULAIRAC,
Professeur à la Sorbonne

Monsieur le Professeur F. GALLAIS,
*Professeur à la Faculté des Sciences de Toulouse,
Directeur de l'Institut de Chimie de Toulouse*

A la mémoire du Docteur J. BAILLIS,
ex-chef de Clinique à la Faculté de Médecine de Paris

A monsieur le Docteur P. THORAIN,
mon oncle.

A monsieur le Docteur J. LACAPÈRE,
Médecin-Chef de l'Institut Prophylactique

A mes Maîtres de l'Enseignement Secondaire,

le R.P. SCLAFFERT, *S.J.*

le R.P. FOULQUIÉ, *S.J.*

le R.P. ESQUIROL, *S.J.*

A mes amis du

Réseau des Emetteurs Français.

SOMMAIRE

PREMIERE PARTIE

ASPECT THEORIQUE

CHAPITRE I. — <i>Généralités</i>	11
a) Visibilité d'une particule microscopique	11
b) Historique du Contraste de phase	12
CHAPITRE II. — <i>Théorie élémentaire de la microscopie en Contraste de Phase</i>	15
a) Rappel sur les Ondes lumineuses	15
b) Etude qualitative des phénomènes	18
I. — Diffraction au niveau de l'objet	18
II. — Trajet des rayons lumineux	20
III. — Cas du Microscope ordinaire	21
IV. — Cas du Microscope à Contraste de Phase	22
c) Considérations générales sur les systèmes optiques	24
I. — Données particulières au contraste de phase	24
II. — Le condenseur	25
III. — La lame de phase	26
d) Obtention du Contraste Maximum dans les cas théoriques ..	29
CHAPITRE III. — <i>Contraste de phase dans les cas généraux</i>	33
a) Cas d'un objet quelconque	33
b) Relations entre les paramètres géométriques et optiques de l'objet	34

c) Contraste maximum dans les cas généraux	35
I. — Premier cas : Contraste sombre	35
II. — Second cas : Contraste clair	37
III. — Discussion des résultats	38
d) Effets dus à la longueur d'onde de la lumière	38
e) Effets dus au trajet optique	40
f) Effets dus au système optique	43
g) Contraste positif, Contraste négatif	45
h) Sensibilité de la méthode	46
I. — Définition transversale	47
II. — Définition longitudinale	47
i) Aspect de l'image en contraste de phase	49
I. — Particule réduite à un point	49
II. — Particule complexe	50

DEUXIEME PARTIE

LES APPAREILS

CHAPITRE I. — <i>Les Objectifs</i>	55
CHAPITRE II. — <i>Les lames de phase</i>	57
a) Forme de la lame	57
b) Lame sde phase à caractéristiques fixes	57
I. — Lame de phase de ZERNIKE	57
II. — Lames de phase obtenues par gravure	58
III. — Lames de phase par évaporation	58
IV. — Achromatisme de la lame de phase	58
CHAPITRE III. — <i>Systèmes à caractéristiques variables</i>	61
a) Lames de phase spéciales	61
I. — Lame de TAYLOR	61
II. — Lame de LOCQUIN	63
III. — Système FRANÇON-NOMARSKI	63

iv. — Compensateur de LYOT	65
v. — Dispositif d'OSTERBERG	66
vi. — Dispositif de KASTLER et MONTARNAL	67
b) Dispositifs utilisables avec une optique standard	68
i. — Demi-sphère de FRANÇON	68
ii. — Dispositif de FRANÇON-NOMARSKI	69
CHAPITRE IV. — <i>Contraste de phase coloré</i>	71
a) Principe	71
b) lame interférentielle de LOCQUIN	73
CHAPITRE V. — <i>Classification des lames de phase</i>	77
TROISIEME PARTIE	
LE MICROSCOPE A CONTRASTE DE PHASE ET SON EMPLOI	
CHAPITRE I. — <i>Le microscope</i>	83
i. — Eclairage	83
ii. — Centrage du système	86
iii. — Les Objectifs	87
iv. — Nomenclature des lames de phase courantes	88
v. — Systèmes déphaseurs particuliers	89
a) Le contraste optimum	91
b) Les préparations	92
i. — Préparations incolores	93
ii. — Préparations colorées	95
c) La Microphotographie	97
CHAPITRE II. — <i>Applications à la Biologie et à la Médecine</i>	101
a) Considérations générales	101
b) Histologie	102
c) Cytologie	107
d) Hématologie	109
e) Bactériologie	114
<i>Conclusions</i>	119
<i>Bibliographie</i>	125

INTRODUCTION

Le microscope composé, constitué d'un oculaire et d'un objectif séparés est une invention ancienne. Galilée en tenta la réalisation qui, théoriquement, permettait un grossissement supérieur à celui de la simple loupe. Mais Huygens considérait ces engins comme nettement inférieurs en qualité à une loupe de même grossissement, du fait des aberrations produites par la lentille simple et non corrigée qui composent alors l'objectif. Néanmoins, dès 1660, il était possible aux curieux de se procurer un microscope qui, tel celui de Hooke, procurait un grossissement total d'une centaine de fois. Le tube portait un luxe de décorations qui témoigne du prestige dont à l'époque s'entourait cet appareil encore rare. Néanmoins, les images étaient assez mauvaises, les corrections d'aberrations n'étant pas faites. La plus évidente, l'aberration chromatique, a été étudiée dès 1740, et une solution imparfaite trouvée, semble-t-il, par Chester Moore Hall, mais il faut attendre les travaux de Dollond, en 1830, pour que des objectifs suffisamment achromatiques, permettent des images nettement supérieures à celles fournies par la loupe simple.

Lister, en Angleterre, permet un pas en avant considérable, par une étude patiente sur l'aberration de sphéricité dont il parvint à dégager les données et les moyens de correction. Vers 1835, Ross réalise enfin des objectifs dépourvus de cette aberration sphérique.

Ce n'est que vers 1877 que les travaux de Abbe, et la théorie célèbre qui en fut la conclusion, permirent de poser les lois quantitatives de l'objectif microscopique théorique et d'en tirer les conclusions pratiques précises qui fournirent la possibilité de réaliser les objectifs dont nous nous servons quotidiennement. Avec la création des optiques apochromatiques par Abbe, en 1886, grâce à l'emploi de verres nouveaux, se termine peut-on dire l'histoire du microscope classique. Certes, les modalités de réalisation ont changé. Les statifs sont devenus de plus en plus complets et pratiques, les catalogues d'objectifs et d'oculaires de plus en plus riches, les dispositifs accessoires de plus en plus nombreux, mais

le système optique proprement dit n'a pas évolué de 1890 à nos jours. Une comparaison nous vient à l'esprit, celle de la machine à vapeur. C'est un lieu commun chez les ingénieurs de répéter qu'une locomotive à vapeur est arrivée à un point de perfection tel que la théorie ne laisse pas prévoir d'amélioration sensible sur les constructions de la fin du siècle dernier. Le microscope classique en est au même point. On atteint pratiquement les limites de résolution prévisibles en tenant compte de la nature ondulatoire des vibrations électromagnétiques visibles, et seul le microscope électronique est capable de fournir des résultats incomparablement supérieurs quant à la définition transversale.

Il n'est point étonnant en conséquence que l'invention par le physicien hollandais Zernike d'un système optique permettant une définition extraordinaire, non dans le sens transversal, mais dans le sens longitudinal, ait fait figure d'une véritable révolution. La possibilité de mettre en évidence des structures très fines uniquement par l'effet de leurs propriétés optiques (diffraction) a complètement modifié les problèmes de microscopie biologique en particulier. Il est désormais possible d'étudier les plus fins détails présents dans une structure vitale et d'expérimenter sous contrôle direct de la vue l'effet des variations extérieures sur le comportement cellulaire. La cinématographie des phénomènes plus précise que toutes les descriptions, permet une interprétation élaborée et étroitement comparative, ce qui n'était guère possible avant l'invention du contraste de phase.

Les principes mêmes sur lesquels repose la méthode sont remarquablement simples, mais malheureusement mal connus de la plus grande part des utilisateurs non spécialistes. Par ailleurs l'obtention d'images correctes et interprétables est soumise à plus de conditions accessoires qu'en microscopie classique. Aussi, nous a-t-il paru indispensable d'insister sur la partie générale et théorique afin de permettre l'amélioration des images obtenues en connaissance des règles de fonctionnement et des particularités de l'emploi de la méthode.

On ne se sert pas d'un microscope à contraste de phase comme d'un microscope classique, c'est évident. Mais encore faut-il connaître les modalités particulières à ce montage optique. Il n'existe pas à notre connaissance d'ouvrage de langue française qui ait traité ce point particulier. Le remarquable ouvrage de Françon [37] est trop théorique pour l'utilisateur et s'adresse plutôt aux opticiens. Les ouvrages américains [14 par ex.] sont d'utilisation difficile. Nous avons donc été tenté de combler, du moins partiellement cette lacune en espérant que nos efforts ne seraient pas totalement vains.

Cet ouvrage, comme son titre l'indique, ne prétend pas donner plus que les conditions générales à remplir pour que les images microscopi-

ques en contraste de phase soient aussi satisfaisantes que possible. Il n'est pas dans nos intentions de donner les résultats obtenus dans chaque cas particulier, ni d'interpréter les images que l'on peut obtenir. Notre but a été beaucoup plus modeste, celui de permettre une réponse à des questions comme celles-ci :

Telle image est mauvaise, pourquoi ?

Comment améliorer la visibilité de telle structure ?

Notre satisfaction sera grande si nous y avons partiellement réussi.

PREMIERE PARTIE

ASPECT THEORIQUE

CHAPITRE PREMIER

GENERALITES

a) Visibilité d'une particule microscopique

Pour qu'une particule de taille microscopique soit visible dans un microscope classique, à travers son système optique, il faut qu'elle fasse intervenir des modifications dans les propriétés de la lumière transmise par elle. Ces modifications seront ensuite analysées par un système sensible.

Les surfaces sensibles utilisées, rétine, émulsion photographique, tube analyseur électronique, sont sensibles à 2 ordres de phénomènes :

— Variations d'amplitude des ondes lumineuses dans le plan d'une image (contraste d'amplitude).

— Variations de la composition spectrale de ces ondes lumineuses (contraste coloré).

Dans de semblables conditions, pour que la particule soit visible dans une préparation microscopique, il faut qu'elle possède une absorption différente de celle du reste de la préparation, absorption soit globale pour les composantes de la lumière qui l'éclaire, auquel cas la particule apparaîtra plus ou moins sombre sur un fond clair, soit sélective, et dans ce cas, elle apparaîtra de teinte différente de celle du fond.

Ces 2 cas correspondent aux conditions bien connues d'observation microscopique, et surtout le second. En biologie en effet, les préparations sont le plus souvent dépourvues de coloration à l'état naturel (transparence complète) et nécessitent l'emploi de colorations aussi spécifiques que possible des structures à étudier.

Il existe des combinaisons optiques bien connues dont le but est identique, faisant apparaître des différences de brillance ou de coloration au niveau de la préparation par des méthodes purement optiques. Ce sont les appareils à fond noir, les optiques à polarisation, à fluorescence primaire, et certains montages peu utilisés quoique fort intéressants comme le Micropolychromar de Zeiss.

Dans tous les cas, connus pour être utilisés depuis longtemps, la visibilité et l'étude des différents objets repose sur l'obtention artificielle de densités optiques ou de couleurs. Nous verrons dans quelle mesure les phénomènes qui les composent ont une parenté avec ceux dont il sera question à propos du Microscope à Contraste de Phase.

En Biologie, dans le cas de la plupart des préparations, les caractères de l'image produite par le système optique ne font intervenir naturellement aucune absorption ni globale ni sélective. L'objet est en effet naturellement incolore et transparent. Il ne sera donc caractérisé optiquement que par la différence de trajet optique entre la lumière qui le traverse et celle qui traverse le milieu environnant. L'onde lumineuse émergeant de l'objet ne diffère de celle venant du milieu que par une propriété à laquelle les systèmes analyseurs (œil . émulsion photo...), sont insensibles : il s'agit de la différence de phase ou déphasage.

Jusqu'à l'invention du contraste de phase dont les principes théoriques de base sont connus depuis longtemps, ce déphasage n'avait pu être utilisé. Nous verrons comment la technique optique a su rendre visible ce déphasage en le transformant en une différence de brillance entre l'image de l'objet et celle du milieu environnant.

L'intérêt de ce genre d'appareillage saute immédiatement à l'esprit lorsque l'on considère la transparence des objets biologiques (coupes minces ou étalements fins). La nécessité de colorations, peu compatible en général avec l'observation fine *in vivo* s'estompe devant l'apparition du contraste de phase qui permet de voir sans manipulations excessives, les plus fines structures cellulaires *in vivo* avec le minimum d'artifices nuisibles.

b) Rappel historique

Il est inutile de revenir sur les travaux de Abbe concernant le mécanisme de la formation des images microscopiques, et ses études absolument capitales sur l'importance de la diffraction lumineuse dans l'obtention de ces images. Ces travaux peuvent être considérés comme la codification de toutes les connaissances théoriques sur la question et bien peu de choses réellement nouvelles sont venues les compléter en un demi-siècle.

C'est très tôt que fut signalée pour la première fois l'introduction de modifications de phase dans un système microscopique.

Dès 1892, Abbe et Bratuschek [21] mirent en évidence les faits suivants :

Utilisant une préparation périodique composée de stries claires et sombres, et en étudiant les relations entre la lumière transmise et la lumière diffractée, ils s'aperçurent qu'il était possible, en modifiant les relations de phase entre ces deux fractions lumineuses, grâce à un coin de verre placé dans le plan focal postérieur de l'objectif, de modifier le contraste de l'image et même de l'inverser totalement dans certains cas. Bratuschek reprit ces expériences en en modifiant le protocole. Utilisant

le même type de préparations, il plaça dans le même plan focal postérieur de l'objectif une lame correctrice à structure périodique faite de stries claires et sombres, dans le but d'atténuer l'intensité de la lumière transmise tout en respectant la lumière diffractée. La préparation-objet avait des stries si claires que la structure de l'objet était difficile à voir dans un microscope ordinaire.

La lame correctrice citée, introduite dans le plan focal postérieur de l'objectif augmentait fortement les contrastes de l'image. Il était ainsi démontré que l'on pouvait améliorer considérablement la visibilité de certaines structures grâce à un artifice atténuant la lumière transmise et respectant la portion diffractée.

Par la suite, le même auteur parvint à inverser le contraste en changeant de lame correctrice. Cette inversion était obtenue par une valeur différente du déphasage au niveau de la lame et intéressant de façon différente la lumière transmise et la lumière diffractée.

Circonstance remarquable, la date de ces expériences est très peu postérieure aux études théoriques de Abbe (1880) sur l'importance des phénomènes de diffraction dans l'image microscopique. Toutes ces expériences sont en plein accord avec la théorie. Il y a tout lieu de penser que seule une impossibilité de réalisation empêcha de trouver dès cette époque une application directe des découvertes ainsi faites, dès la fin du siècle dernier.

Des expériences similaires, postérieures de quelques années et dues à Conrady [27] et Rheinberg [87] marquent la suite de ces travaux théoriques dans la période 1904-1906. Rheinberg étudia complètement les spectres de diffraction de préparations à structure périodique et parvint à contrôler à volonté le contraste de l'image ainsi obtenue par la modification expérimentale de certains de ces spectres. Ce fut le premier exemple de contraste modifié à volonté par le jeu de déphasage contrôlé.

Mais les perfectionnements théoriques et la première application pratique de la méthode sont dus au physicien hollandais Zernike. Dans le premier ouvrage [102] publié par ce physicien en 1934 sur ce sujet, l'auteur insistait sur les avantages que présentait la méthode du contraste de phase par rapport à la méthode traditionnelle de Foucault [35] dans le but d'apprécier les qualités optiques d'un système de miroirs. La même année, C.R. Burch [23] publia les résultats expérimentaux obtenus sur ce sujet grâce à la méthode de Zernike. Cette publication s'adresse surtout aux opticiens en mettant à leur disposition une méthode de mesure très sensible et d'utilisation simple.

La méthode du contraste par déphasage met en évidence les différences de trajet optique au niveau des irrégularités des systèmes réfléchissants ou réfractants interposés sur le trajet des rayons lumineux. Leur application à l'appréciation de la qualité optique des miroirs et len-

tilles astronomiques est utilisée dans une large mesure et donne lieu à des réalisations pratiques diverses toutes basées sur le même principe. Une des plus connues est celle due au regretté B. Lyot en vue de l'étude de l'imperfection des lentilles de son coronographe ou la tolérance optique est extrêmement réduite [66-67].

De par leur nature même, les phénomènes permettant la visualisation directe des déphasages provenant d'irrégularités dans les trajets lumineux ont incité les opticiens à en tenter l'application à la microscopie où les différences de trajet optique jouent un rôle capital dans les phénomènes de diffraction étudiés par Abbe.

Dès 1935, Zernike avait pris différents brevets qui furent cédés dès cette date à la firme Zeiss. Ceci confirme que Zernike comprit très tôt l'importance pratique que ses travaux pouvaient prendre en microscopie. Cependant, il faut attendre 1941 pour que des résultats d'expérimentation systématique probants soient publiés par deux ingénieurs des établissements Zeiss, Köhler et Loos [58, 64, 65]. Ces publications suscitèrent immédiatement un grand intérêt parmi les spécialistes. Burch et Stock publièrent à leur tour en 1942 leurs protocoles d'expériences et leurs résultats [24]. Ils utilisaient un microscope dont la source lumineuse en forme de fente correspondait à une lame déphaseuse de même forme placée dans le plan focal postérieur de l'objectif.

Depuis cette date, de nombreuses publications se sont succédées, entraînant un nombre considérable de publications sur les aspects les plus divers, théorique, technologique ou pratique.

L'utilisation du contraste de phase est entré actuellement dans sa période d'extension, tant en Biologie que dans les autres disciplines utilisant le microscope comme outil de travail. L'importance que prend la méthode du contraste de phase depuis ces dernières années, avec l'apparition dans le commerce d'équipements de fonctionnement satisfaisant justifie donc une tentative de mise au point de cette question, portant sur les techniques qui lui sont particulières pour le biologiste. Les publications nombreuses mais dispersées qui s'y rapportent ne permettent pas toujours une vue d'ensemble de la question.

CHAPITRE II

THEORIE ELEMENTAIRE DE LA MICROSCOPIE EN CONTRASTE DE PHASE

S'il est possible d'avoir une idée générale sur la formation d'une image microscopique ordinaire grâce aux simples lois de l'optique géométrique, il semble au contraire tout à fait impossible d'expliquer la formation d'une image en contraste de phase sans entrer dans les considérations de l'optique physique relatives à la nature ondulatoire de la lumière et sur les phénomènes qui en découlent.

a) Les ondes lumineuses

La nature vibratoire ou plus exactement ondulatoire de la lumière est une acquisition déjà ancienne puisque Ch. Huygens l'admettait déjà explicitement en 1690 et en tirait déjà les conclusions qualitatives exactes que nous connaissons à propos de la biréfringence et de la polarisation. Il n'est que de relire son extraordinaire *Traité de la Lumière* pour retrouver en un français de style admirable de clarté et de pureté classiques une quantité considérable de notions précises à ce sujet.

C'est à tort que certains esprits superficiels ont voulu voir dans le Photon et dans la théorie quantique un retour à la théorie corpusculaire de Newton.

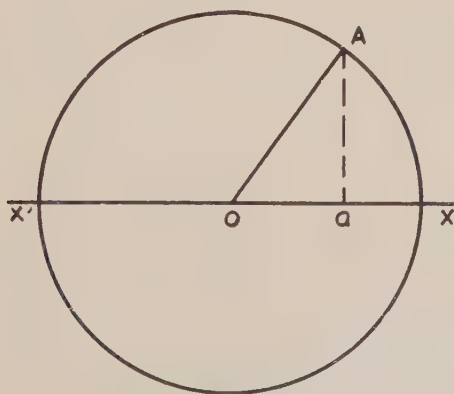


Fig. 1

La nature ondulatoire et électromagnétique de la lumière permet la représentation graphique sous forme d'une sinusoïde dont l'amplitude peut être représentée comme la grandeur en fonction du temps de la projection d'un vecteur OA tournant d'un mouvement circulaire uniforme autour de son point d'application O sur un axe $x'Ox$.

Cette représentation classique est connue sous le nom de représentation vectorielle de Fresnel.

La courbe est donc représentative de la fonction trigonométrique bien connue

$$Oa = OA \cos (\omega t + \varphi)$$

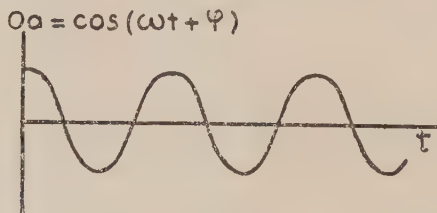


Fig. 1 bis

dans laquelle t représente le temps, ω la vitesse angulaire de OA autour de O et φ la valeur de l'angle xOA pour $t = 0$. Nous voyons immédiatement que deux ondes peuvent différer soit par leur amplitude OA (correspondant au contraste d'amplitude et à une différence de luminosité ou de brillance), par leur vitesse angulaire ω ce qui correspond à une différence de fréquence, donc de couleur (contraste coloré), soit encore par la valeur de φ . C'est cette dernière différence qui retiendra toute notre attention, car c'est précisément ce point qui est l'objet de cette étude.

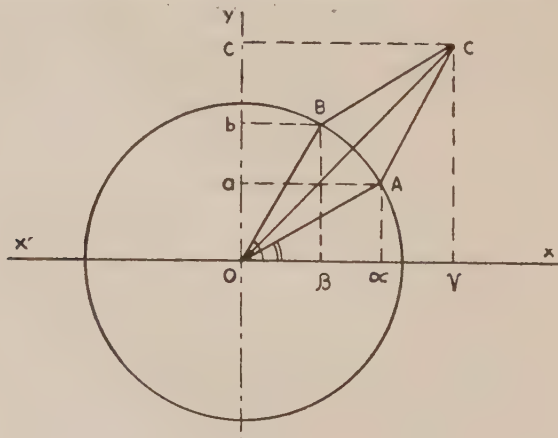


Fig. 2

Précisons accessoirement que dans un train d'onde lumineuse, il ne sera pas tenu compte des 2 vecteurs orthogonaux qui constituent les composantes électrique et magnétique.

Deux ondes A et B pouvant coexister, il est naturel de rechercher quelles peuvent être les conséquences de cette coexistence. Nous pouvons de toute façon conclure provisoirement que cette conséquence sera la somme des 2 vecteurs OA et OB, et que cette somme correspondra à un troisième vecteur, représentatif d'une onde C résultante de A et de B.

Représentons les vecteurs OA, OB et leur somme OC sur le cercle trigonométrique.

Chacun des vecteurs OA pour A, OB pour B sera défini dans le système de coordonnées choisies, par les valeurs :

$$Oa = \sin (\omega t + \varphi_a). OA$$

$$Oz = \cos (\omega t + \varphi_a). OA$$

$$Ob = \sin (\omega t + \varphi_b). OB$$

$$O\beta = \cos (\omega t + \varphi_b). OB$$

On en conclura de même pour la résultante C

$$Oc = \sin (\omega t + \varphi_c). OC$$

$$O\gamma = \cos (\omega t + \varphi_c). OC$$

C'est-à-dire que OC sera défini par OA et OB de telle manière que

$$Oc = OA. \sin (\omega t + \varphi_a) + OB. \sin (\omega t + \varphi_b)$$

$$O\gamma = OA. \cos (\omega t + \varphi_a) + OB. \cos (\omega t + \varphi_b)$$

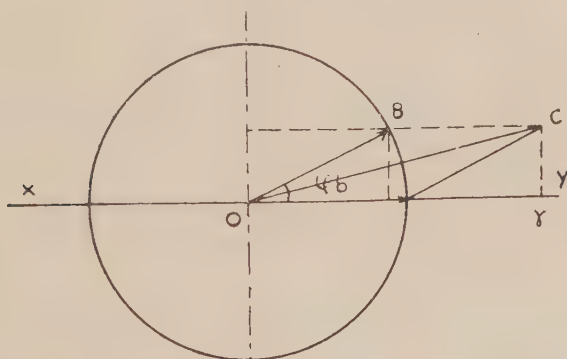


Fig. 3

Nous voyons immédiatement quelle importance prennent les relations de phase entre 2 systèmes d'ondes dans le calcul de l'onde résultante. Il est impossible de négliger les différences de phase dans l'étude et la prévision des phénomènes.

Pour des raisons de simplifications d'écriture, on est amené à considérer non plus φ_a et φ_b , mais seulement leur différence ce qui revient à

poser pour φ_a une valeur indistinctement nulle et à compter l'angle φ_b à partir de 0. Ceci conduit à une forme simplifiée des expressions relatives à OC :

$$O\gamma = OA + OB \cos \varphi_b$$

$$Oc = OB \cdot \sin \varphi_b$$

et dont la représentation graphique (fig. 3) est absolument comparable à celui donné figure 2 avec pour toute modification une simple rotation autour de O et de valeur $-\varphi_a$.

Ceci est équivalent à un transport d'origine et ne change rien à la nature des phénomènes. La notion de phase relative de OA et OB reste absolument indépendante de la notation et de la modification d'origine ainsi effectuée.

Une précision supplémentaire s'impose : dans tous les calculs, nous avons supposé sans raison apparente la valeur ω identique pour OA et OB. Ceci est une nécessité physique, les systèmes d'ondes déphasés qui vont nous occuper sont de même fréquence (faute de quoi on aurait affaire à des systèmes colorés, ce qui n'est pas le cas), et de plus dans des systèmes d'ondes de fréquences différentes, la notion de relation de phase n'a pas de sens précis, les déphasages relatifs entre 2 ondes étant une fonction également périodique, variant cycliquement de 0 à 2π selon

$$\varphi = \varphi_0 + (\omega_1 + \omega_2) t$$

b) Etude qualitative des phénomènes

I. — DIFFRACTION AU NIVEAU DE L'OBJET.

Soit un objet p très petit, transparent, entouré d'un milieu optiquement homogène m, éclairé par une source lumineuse. Régions cet éclairage selon la méthode de Köhler, ce qui revient à produire un éclairage en lumière parallèle.

Définissons par ailleurs le trajet optique d'un corps transparent quelconque : ce trajet optique que nous noterons Δ a la dimension d'une longueur et a pour expression :

$$\Delta = n.e$$

ou n est l'indice de réfraction de corps transparent,
e son épaisseur.

Nous supposons que les dimensions de l'objet sont toutes très petites, que cet objet n'est ni absorbant ni coloré, ce qui représente à peu près les propriétés usuelles du matériel biologique, ou plus exactement ses propriétés limites.

L'interposition de cet objet p va modifier les propriétés de la lumière qui le traverse : c'est le phénomène bien connu de la *diffraction*. Une portion de la lumière continue son chemin sans déviation (*portion transmise*), l'autre est déviée et semble rayonner à partir de l'objet (*portion diffractée*).

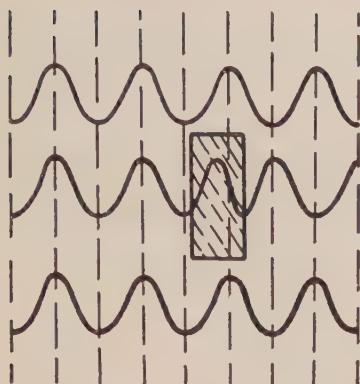


Fig. 4

Si maintenant nous considérons la structure de la lumière ayant traversé p et celle ayant passé au travers du milieu m, si nous appelons respectivement ces 2 systèmes P et M, nous pouvons faire les conclusions suivantes :

P et M sont de même amplitude puisque l'objet est transparent.

Mais leur phase relative diffère (fig. 4).

Si nous représentons vectoriellement le phénomène, (fig. 5), cette différence de phase a pour valeur :

$$\varphi_p = 2 \pi \frac{\Delta_p - \Delta_m}{\lambda}$$



Fig. 5

mais comme l'angle φ_p est très faible, puisque l'objet est de très petite taille, nous pouvons confondre son sinus avec sa tangente et écrire, selon le schéma ci-dessus :

$$\vec{OP} = \vec{OM} + \vec{MP}$$

selon les règles du calcul vectoriel. Avec les remarques que nous avons faites, MP est « perpendiculaire » à OM, et comme il s'agit d'un vecteur, il est déphasé par rapport à OM de $\pi/2$.

A quoi correspond cette décomposition vectorielle ? Il va de soi que OM est l'onde M, et OP l'onde P dont nous avons parlé et qui représente l'onde lumineuse après traversée de l'objet. L'onde représentée

par MP est tout simplement la portion diffractée par l'objet et qui semble rayonner autour de lui. Cette décomposition est justifiée vectoriellement, mais physiquement il sera toujours impossible de différencier P de la somme de M et du vecteur MP que nous nommerons D. Le schéma vectoriel est bien représentatif de la combinaison des 2 ondes et $M + D$ sera toujours équivalent à P. Nous avons donc toujours le droit de considérer P comme la somme vectorielle de l'onde M et d'une onde D déphasée par rapport à celle de $\pi/2$ et issue de l'objet (fig. 6).

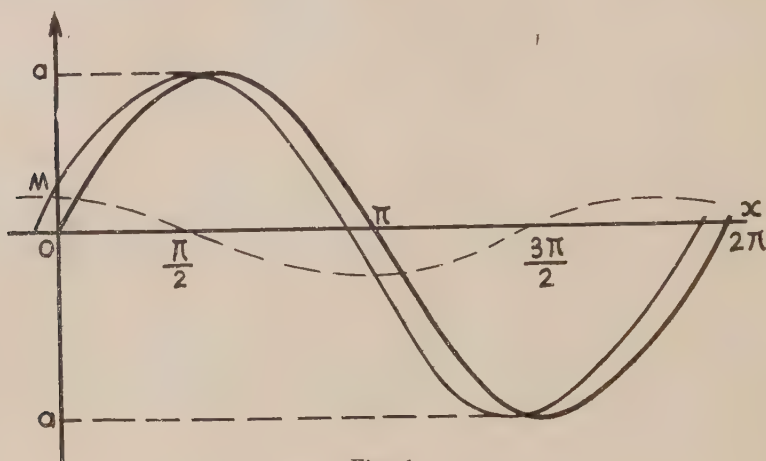


Fig. 6

Ceci est du reste conforme aux faits suivants : Si nous supprimons l'objet de la préparation, l'onde M persiste inchangée, au contraire, lorsque nous arrivons à empêcher la pénétration de l'onde M dans le microscope, le champ est uniformément obscur, à moins qu'un objet faisant apparaître une diffraction par sa présence, ne se signale par l'onde D : c'est le principe du fond noir. Que M et D soient déphasés l'un par rapport à l'autre, le fait ne peut être mis en évidence dans un microscope puisque l'œil n'est pas sensible aux différences de phase.

Si nous récapitulons les phénomènes, nous nous trouvons en présence d'un objet et d'un milieu environnant transparents éclairés en lumière parallèle (ceci n'est du reste pas obligatoire). Après traversée de la préparation, la lumière est constituée comme il suit :

Une onde plane (l'onde M).

Un cône lumineux ayant l'objet p comme sommet et dont le vecteur représentatif est déphasé de 90° par rapport à M.

II. — TRAJET DES RAYONS LUMINEUX.

Considérons d'abord l'onde M. Grâce à l'éclairage de Köhler, cette onde M est plane. Après traversée de l'objectif, cette onde viendra converger au foyer de cet objectif et y former l'image de la source, puis

en divergera pour venir couvrir uniformément tout le champ du microscope.

L'onde D a pour origine l'objet p. Après traversée de l'objectif, D viendra converger en un point i pour y former l'image de l'objet p.

En ce point i se superposent donc l'onde D et l'onde M qui recouvre tout le champ. Ces 2 ondes vont alors se recombinaer avec leur phase et leur amplitude respective selon

$$\vec{M} + \vec{D} = \vec{P}$$

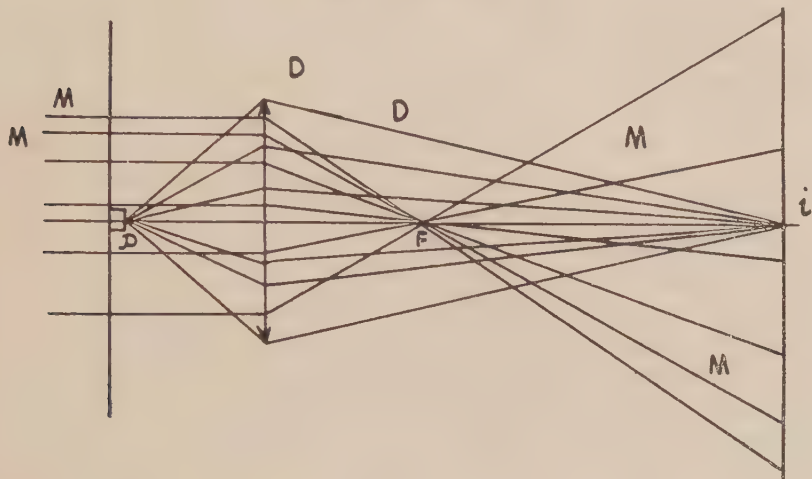


Fig. 7

L'image sera constituée en i avec des distributions d'amplitude et de phase semblables à celles qui existaient au niveau de p. La conclusion tirée de cette similitude des répartitions d'amplitude et de phase au niveau de l'objet et de l'image est souvent considérée comme un théorème :

« Quand la totalité de la lumière diffractée par un objet est admise et transmise par un système optique dépourvu d'aberrations, les distributions d'amplitude et de phase dans le plan de l'image et dans celui de l'objet sont semblables et l'image est similaire à l'objet. » Ceci ne représente évidemment qu'un cas limite et impossible à atteindre en réalité : on ne sait pas construire de système admettant la totalité de la lumière diffractée ni totalement dépourvu d'aberration. On sait néanmoins se rapprocher suffisamment de ces conditions pour que le théorème soit qualitativement valable.

III. — CAS DU MICROSCOPE ORDINAIRE.

L'œil n'étant pas sensible aux différences de phase, nous pouvons conclure de ce qui précède que, dans les conditions que nous nous som-

mes fixées et qui ne sont pas tellement extraordinaires, un microscope classique fournira une image inobservable, et ce, d'autant que son optique sera de meilleure qualité et qu'il sera utilisé de façon rationnelle.

En d'autres termes, si nous observons dans un excellent microscope bien réglé un objet transparent et incolore, nous sommes à peu près sûrs de ne rien voir.

Ceci peut paraître insolite car il est notoire que dans certains cas on voit parfaitement sous un microscope classique un objet incolore et transparent dans un milieu également transparent. Le cas le plus connu est celui de la bulle d'air incluse intentionnellement ou non dans le baume. Mais, ici, les différences d'indice de réfraction sont élevées et à la diffraction s'ajoutent des phénomènes de réflexion totale ou partielle au niveau des interfaces dues à des grandes différences d'indices. Il y a donc de grandes perturbations dans le trajet des rayons lumineux, certains sont éparpillés dans l'espace et ne peuvent pénétrer dans l'objectif, ou bien pénètrent sous des incidences pour lesquelles les aberrations sont particulièrement fortes.

La répartition énergétique au niveau de l'objet n'est plus alors comparable à celle de l'image, et le théorème n'est plus valable.

On sait également qu'en utilisant l'éclairage oblique on arrive à rendre visibles des détails que l'éclairage axial usuel laisse inapparents, de même en rétrécissant l'ouverture du diaphragme. On utilise alors les aberrations d'un système optique produites soit par l'emploi hors de l'axe (coma) soit par la diminution de l'ouverture numérique. Dans les deux cas, le théorème n'est plus applicable.

Pour peu satisfaisantes du point de vue théorique que soient ces méthodes, elles ont rendu et rendent encore à certains microscopistes des services précieux. Cependant, elles ne sont applicables que lorsque les différences de trajet optique entre p et m sont suffisantes. Si cette différence devient suffisamment faible, le contraste devient nul et l'image cesse d'être visible.

IV. — CAS DU MICROSCOPE A CONTRASTE DE PHASE.

Le microscope à contraste de phase a précisément été réalisé pour mettre en évidence des particules de trajet optique très peu différent de celui du milieu environnant. En fait, le principe sur lequel il s'appuie est basé directement sur une condition d'inapplicabilité du théorème, les répartitions d'amplitude et de phase étant différentes au niveau de l'objet et de l'image, grâce à des modifications des propriétés relatives de M et de P .

Si nous reprenons le schéma des trajets lumineux dans un microscope quelconque, les trajets de M et de D sont essentiellement différents. M converge au foyer de l'objectif pour y former l'image de la

source, tandis que D vient converger dans le plan image situé beaucoup plus loin (voir figure 7, p. 21).

Au niveau du foyer de l'objectif, M occupe seulement l'image de la source tandis que D occupe une place beaucoup plus large. Ceci va permettre d'agir sur M en totalité, tout en respectant D (ou vice versa). Si l'on superpose à l'image de la source un dispositif modifiant la phase de la lumière qui le traverse, n'intéressant donc que M, tout en respectant D, la représentation vectorielle des 2 ondes va être modifiée par ce nouveau déphasage. Dans le cas où celui-ci est de valeur égale à $\pm \pi/2$, nous aurons désormais affaire à 2 ondes, D (inchangée) et M', d'amplitude égale à M mais déphasée par le dispositif ajouté.

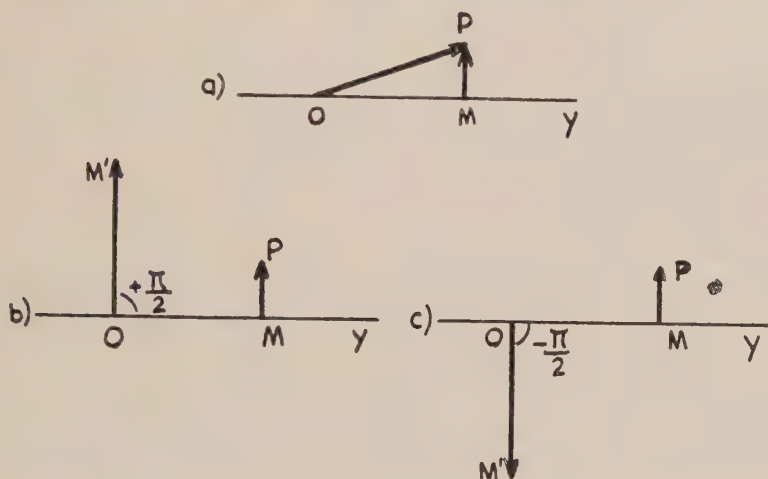


Fig. 8

Les vecteurs OM' et MD ne seront plus « perpendiculaires » mais « parallèles » et de même sens ou de sens opposé selon le signe du déphasage. De toute façon, la somme de ces 2 vecteurs ne peut plus être égale à P comme précédemment. Comme ils sont portés sur des axes parallèles, leur somme devient la somme algébrique de leurs amplitudes. Le nouveau vecteur ne peut plus être égal à P, et son amplitude sera forcément différente de celle de M. Il en résultera un fond lumineux constitué par M' de même amplitude que M et un objet ou plus exactement son image, représenté par la somme algébrique P de M' et de D, d'amplitude donc différente de celle du fond. L'image ainsi obtenue sera donc plus claire ou plus foncée que le fond. De toute façon, nous avons abouti à la formation d'une image que l'œil peut apprécier puisqu'il s'agit d'une différence d'amplitude.

Les principes généraux de la microscopie en contraste de phase consistent à modifier les phases relatives de 2 systèmes d'ondes dus à la présence d'irrégularités optiques de manière à obtenir une nouvelle somme

vectorielle entre les 2 systèmes dont l'amplitude soit différente de celle de la somme des composantes avant la traversée du système déphaseur.

Il reste à étudier quelles sont les modalités techniques de telles transformations, leurs conditions de fonctionnement et les problèmes à résoudre en vue de l'obtention du contraste optimum.

Mais précisons tout de suite que les conclusions ainsi obtenues résultent de prémisses et d'hypothèses simplificatrices arbitrairement choisies et correspondant à des cas limites. Il faudra tenir compte désormais de conditions réelles qui amèneront des modifications et des révisions des calculs et des résultats. Le principe général étant acquis, il faudra donc examiner des cas réels s'éloignant des conditions limites. Des modifications inévitables seront ainsi à envisager.

c) Considérations générales sur les systèmes optiques

I. — PARTICULARITÉS DU CONTRASTE DE PHASE.

La seule différence qui existe entre le microscope classique et le microscope à contraste de phase réside dans le système permettant de déphaser la composante transmise et la composante diffractée par l'objet de la valeur voulue pour permettre une addition algébrique et non plus vectorielle des 2 vecteurs composant l'un la fraction transmise, l'autre la fraction diffractée.

Nous avons déjà vu que ceci est rendu possible par les trajets différents de ces 2 ondes, et en particulier au niveau de l'image de la source lumineuse fournie par le système condenseur-objectif. En intercalant un système déphaseur couvrant exactement cette image, on obtiendra le déphasage désiré.

Pourvu que cette superposition soit exacte, et de ce fait, que le déphasage supplémentaire n'intéresse que l'une des portions lumineuses (l'une ou l'autre au choix, le déphasage étant relatif), l'emplacement du système déphaseur est indifférent et peut se situer à n'importe quel niveau du système optique. Seules des considérations pratiques amènent à un choix déterminé. La plupart des réalisations comportent ce système déphaseur au niveau du foyer postérieur de l'objectif, mais certaines réalisations sont très différentes. Citons par exemple, le système Françon-Nomarski, qui dans ses deux réalisations, comporte un système déphaseur placé après un premier oculaire, ou la demi-sphère de Françon dans laquelle le déphasage est produit avant pénétration de la lumière dans le microscope proprement dit.

Sur le schéma déjà décrit *fig. 7*, le faisceau de lumière transmise vient converger au foyer de l'objectif en formant l'image de la source lumineuse. Cette disposition provient du réglage de l'éclairage dit « Eclairage de Köhler » dont il a déjà été question. Ce réglage selon

Köhler consiste à éclairer l'objet en lumière parallèle. Pour ce, on forme à l'aide d'une optique accessoire l'image du filament de la lampe à incandescence au foyer inférieur du condenseur, qui coïncide du reste par construction avec le plan de diaphragme d'éclairage. Les rayons repris par l'objectif vont former une image réelle au foyer de ce dernier. Toute la fraction transmise par la préparation se retrouve à cet endroit. Dans les cas habituels, la lame de phase se trouve dans le plan de cette image (plan focal postérieur de l'objectif). La portion de la lame déphaseuse qui recouvre l'image de la source, et intéresse donc la fraction transmise est appelée Zone conjuguée. Le reste de la lame, traversé par la portion diffractée de la lumière porte le nom de Zone complémentaire.

Le déphasage relatif des 2 systèmes d'ondes transmise et diffractée sera produit par une différence de trajet optique entre les 2 zones de telle sorte qu'un nouveau déphasage de $\pm \pi/2$ sera obtenu. Le déphasage relatif entre les 2 systèmes d'ondes sera obtenu avec sélectivité, aboutissant au résultat recherché.

II. — LE CONDENSEUR.

Si le condenseur est corrigé de manière satisfaisante de ses aberrations, dans le cas de l'éclairage de Köhler, l'onde émergente qui éclaire l'objet est plane. Ce condenseur est habituellement réalisé comme un condenseur Abbe classique. Les reliquats d'aberration de sphéricité qu'il présente ne sont pas une gêne très importante. La seule partie spécialement conçue pour l'utilisation en contraste de phase est le diaphragme dont l'image viendra se former à travers l'objectif sur la « lame de phase », y occupant ce que nous appelons la zone conjuguée.

La forme de ce diaphragme peut être théoriquement quelconque pourvu que la zone conjuguée soit exactement superposable à son image à travers le système objectif-condenseur.

Ainsi la réalisation initiale de Burch et Stock (1942) comportait un diaphragme à fente linéaire, de même la zone conjuguée, ce qui comporte une facilité de réalisation pratique indiscutable par rapport aux autres formes possibles. Le gros écueil de ce genre de réalisation est de faire apparaître une direction privilégiée perpendiculaire au grand axe de symétrie du diaphragme. Dans l'observation de préparations à structures périodiques les détails structuraux disparaissent lorsqu'ils sont disposés parallèlement à la fente du diaphragme. Cette disposition aurait donc pu gêner les observations des structures périodiques que l'on trouve par exemple au niveau des fibres musculaires, et que le hasard aurait disposé selon cette direction privilégiée. Il est néanmoins possible, pour certains usages de conserver cette disposition linéaire du diaphragme, en particulier pour l'étude de certaines matières à structure fibreuse de direction connue (métallographie, par exemple).

Dans le cas des utilisations courantes du Microscope à Contraste de phase, et particulièrement en biologie, les constructeurs ont adopté pour la plupart le diaphragme annulaire. Il n'y a plus dans ce cas de direction privilégiée et l'appareillage qui en résulte est d'une application beaucoup plus générale.

Les dimensions de l'anneau du diaphragme sont également des facteurs très importants. Nous allons sommairement les étudier en considérant la « lame de phase » et plus particulièrement la zone conjuguée.

III. — LA LAME DE PHASE.

Ce terme assez barbare et tout compte fait assez impropre s'applique au système optique permettant de faire subir à la lumière transmise et à la lumière diffractée des modifications relatives telles que leur différence de phase devienne égale à $n\pi$, n étant un entier quelconque, de telle manière que nous puissions retomber dans le cas de vecteurs coaxiaux, et obtenir ainsi une addition algébrique, condition *sine qua non* de l'apparition d'un contraste d'amplitude auquel l'œil est sensible.

Comme ces 2 ondes avaient une différence de phase de $\pi/2$, il est aisé d'en conclure que la différence de trajet optique pour les 2 composantes lumineuses doit être égal à $\pm \pi/2$, à $2k\pi$ près. Ce résultat est obtenu en donnant à la zone conjuguée, intercalée sur le trajet de la composante transmise, une différence de trajet optique de ladite valeur par rapport au reste de la lame de phase, appelée zone complémentaire.

Il est évident, du fait du principe même de la formation de l'image, que la qualité de celle-ci sera d'autant meilleure que la fraction de composante diffractée qui passe par la zone conjuguée (où ne devrait passer que la composante transmise) sera la plus faible possible. Il n'existe en effet pas dans le microscope de point de l'espace où ces 2 composantes soient totalement séparées. Au niveau de la zone conjuguée, les deux ondes se chevauchent. Comme par ailleurs, les dimensions du diaphragme, et par voie de conséquence, de la zone conjuguée ne peuvent être infiniment étroites, cette séparation totale est impossible. Néanmoins on comprend l'intérêt qu'il peut y avoir à réduire les dimensions de ces éléments, afin de réduire ce chevauchement inopportun.

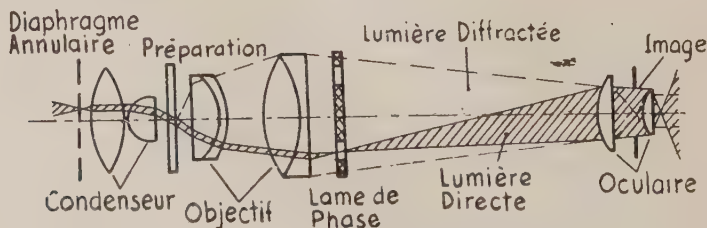


Fig. 9. — Schéma du microscope à contraste de phase.

Dans le cas d'un diaphragme circulaire, la diminution de son diamètre d'ouverture entraîne une baisse de l'ouverture numérique du condenseur et par voie de conséquence une diminution parallèle de l'ouverture numérique de l'objectif. Il en résulte un affaiblissement rapide et inadmissible du pouvoir résolvant de l'objectif et une perte rapide des qualités du système. Il n'est donc pas possible de se diriger dans cette voie. La conservation d'un cône lumineux d'angle aussi grand que possible est indispensable si l'on veut respecter l'o.n. du système optique et son pouvoir de définition.

Ceci joint aux considérations sur les dimensions du diaphragme et de la zone conjuguée amène à concevoir ces dispositifs sous une forme annulaire.

Théoriquement « la forme optimum du diaphragme et de la zone conjuguée est la forme annulaire, de diamètre aussi grand que possible et de largeur aussi réduite que possible ».

Cependant, des conditions de réalisation pratique limitent ces considérations théoriques :

Un diaphragme annulaire de largeur très réduite, de même que la zone conjuguée, fait apparaître des effets de bord dus à des diffractions indésirables au niveau de ces discontinuités.

De même, l'augmentation exagérée du diamètre moyen de ces dispositifs provoque, du fait des aberrations sphériques inévitables du condenseur et de l'objectif, des déphasages perturbateurs dans le système, aboutissant ainsi à des relations de phase entre les 2 composantes totalement différentes de celles qui avaient été escomptées.

Un compromis habituellement adopté consiste à limiter les dimensions de la zone conjuguée à une valeur habituellement comprise entre 1/3 et 2/3 du diamètre de l'ouverture dans le plan de la lame de phase. Corollairement, le diamètre moyen du diaphragme voit ses dimensions fixées en conséquence au niveau du condenseur.

Constitution de la lame de phase.

La zone conjuguée devant présenter par rapport à la zone complémentaire une différence de trajet optique égale à $\lambda/4$ soit $\pi/2$, deux méthodes s'offrent pour obtenir cette propriété, l'une par différence d'épaisseurs, l'autre par différence d'indices de réfraction.

Dans le cas de zones d'épaisseurs différentes, on obtient par gravure un anneau soit en creux, soit en relief, dont le trajet optique est :

$$\Delta = (E - e) n$$

et le déphasage correspondant :

$$\varphi_1 = \frac{2 \pi n (E - e)}{\lambda}$$

où E et e représentent les épaisseurs respectives des deux zones (figures 10 a et b).

Le même résultat est obtenu en utilisant pour la réalisation des 2 zones des matériaux d'indice différent, mais de même épaisseur et dans ce cas la valeur du déphasage se trouve déterminée de la même manière selon la formule :

$$\varphi_1 = \frac{2 \pi e (n_1 - n_2)}{\lambda}$$

et où n_1 et n_2 sont les indices respectifs des matériaux constituant les 2 zones (fig. 10 c).

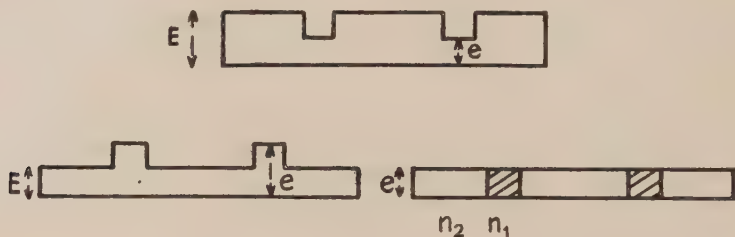


Fig. 10 a, b, c.

Ceci nous amène à considérer directement 2 notions importantes :

1° Le déphasage, fonction de la longueur d'onde λ , ne saurait être identique pour les lumières de différentes constitutions chromatiques. Dans un système simplifié, le fonctionnement ne sera théoriquement correct que pour le cas de l'utilisation d'un éclairage monochromatique. Pratiquement, l'appareillage pourra être utilisé dans une plage de longueurs d'ondes relativement étendue, mais l'utilisateur sera cependant limité dans cette voie par une baisse de contraste.

Une fois de plus se retrouve le fait bien connu du fonctionnement optimum des systèmes dioptriques en lumière monochromatique de longueur d'onde correspondant à celle pour laquelle il a été établi.

Naturellement, les constructeurs se sont efforcés de minimiser cet inconvénient par le choix judicieux des matériaux transparents associés de manière convenable, pour obtenir un achromatisme suffisant, comme cela avait déjà été fait pour les objectifs usuels.

2° Un fonctionnement correct peut être obtenu à $k \pi$ près de la valeur de φ_1 , ce qui revient à dire que φ_1 peut prendre deux valeurs de signe opposé :

$$\varphi_1 = \pm \pi/2 + 2 k \pi$$

Dans ces deux cas, la somme vectorielle des deux composantes à la sortie de la lame de phase sera bien équivalente à leur somme algébrique (contraste d'amplitude). Le contraste sera de toute façon satisfaisant mais l'aspect de la préparation sera différent : l'objet apparaîtra soit plus clair soit plus foncé que le fond :

Soit un objet P d'indice de réfraction n_p et d'épaisseur e_p , inclus dans un milieu de montage d'indice n_m . Le déphasage aura pour valeur :

$$\varphi_p = \frac{2 \pi e_p (n_p - n_m)}{\lambda}$$

Si $n_p > n_m$ (objet plus réfringent que le milieu), l'angle φ_p sera > 0 . La composante diffractée sera déphasée de $+\pi/2$.

Si la lame de phase déphase à nouveau l'onde diffractée par rapport à l'onde transmise de $+\pi/2$, la rotation totale sera donc pour la composante diffractée de $+\pi$. Les vecteurs représentatifs des 2 composantes seront de sens opposés, leur somme algébrique sera inférieure à la composante transmise : l'objet apparaîtra plus sombre que le fond.

En changeant le signe d'un seul de ces 2 déphasages successifs, l'objet aurait apparu plus clair. De ceci, deux conclusions :

Avec une lame de phase donnée, un objet apparaîtra plus clair ou plus foncé que le fond selon que son indice sera plus élevé ou plus faible que celui du milieu de montage.

Avec une préparation donnée, un objet peut apparaître plus clair ou plus sombre que le fond selon le sens du déphasage introduit par la lame de phase.

Il existe donc quatre combinaisons possibles, qualitativement différentes, mais dont les résultats sont similaires 2 à 2.

Naturellement ces considérations sont purement qualitatives, mais elles indiquent bien l'allure générale des phénomènes. La transposition en valeurs numériques ne fera qu'apporter des précisions de détail sur la qualité des images obtenues.

d) Obtention du contraste maximum

Les conditions théoriques pour la transformation du déphasage du à l'objet en contraste d'amplitude optimum entre l'image de l'objet et le fond sont :

1° Une superposition aussi exacte que possible de l'image du diaphragme fournie par le système optique condenseur-objectif et de la zone conjuguée de la lampe de phase.

2° Une différence de trajet optique entre la zone conjuguée et la zone complémentaire aussi proche que possible de $\frac{\lambda}{4}$.

Ces deux conditions ont fait l'objet d'une étude approfondie dans les pages précédentes, inutile donc d'y revenir.

Il existe de plus une condition supplémentaire, sans rapport direct avec les phénomènes propres au microscope à contraste de phase, et qui tient à la notion même de contraste entre deux plages de luminance différente.

Le contraste entre 2 plages lumineuses de même composition spectrale s'exprime par la relation :

$$K = \frac{L_0 - L_1}{L_0}$$

où L_0 et L_1 sont les luminances des 2 plages.

Si nous admettons que L_m est la luminance du fond et L_p celle de l'objet, correspondant respectivement aux ondes M et P, avec la relation déjà reconnue

$$\vec{P} = \vec{M} + \vec{D}$$

où D est la composante diffractée, il est possible de calculer une relation entre les valeurs de P et M d'une part et le contraste K d'autre part.

$$K = \frac{L_m - L_p}{L_m}$$

Les luminances étant fonction des carrés des amplitudes, il vient

$$K = \frac{M^2 - P^2}{M^2}$$

Le contraste maximum étant par définition égal à l'unité, ceci entraîne

$$P^2 = 0$$

ou autrement,

$$(\vec{M}' + \vec{D})^2 = 0 \quad \text{soit} \quad \vec{M}' = -\vec{D}$$

ce qui revient à dire que les 2 vecteurs M' et D doivent être égaux et de signe contraire *après traversée de la lame de phase*. Ceci correspond à une égalité de leurs amplitudes tandis que leur phase relative doit être de π .

Cette égalité des amplitudes n'est en général jamais réalisée naturellement. Sauf cas particuliers, la composante diffractée D est d'amplitude nettement inférieure à celle de la composante transmise. Comme il est impossible d'amplifier la première, la seule solution possible est d'affaiblir la seconde par l'emploi d'une zone conjuguée absorbante, et dont le coefficient de transmission T soit tel que :

$$T.M'^2 = D^2$$

Un tel coefficient est un élément important du contraste, mais sa valeur est liée aux caractéristiques optiques de l'objet examiné dont dépend l'intensité de D.

Dans le cas où

$$\frac{T.M'^2 - D^2}{T.M'^2} = K = 1$$

le calcul élémentaire exprime que, puisque P^2 doit être nul,

$$(\sqrt{-T} \cdot \vec{M}' + \vec{D})^2 = 0$$

relation qui lie T , M' , et D . Dans ce cas, pour une valeur donnée de T , le contraste est bien égal à l'unité; mais puisque P est nul, *l'objet apparaît en noir* sur un fond clair, ce qui correspond évidemment à une visibilité maximum.

Le contraste K peut également s'exprimer de façon symétrique :

$$K = \frac{P^2 - M'^2}{P^2}$$

L'hypothèse du contraste maximum induit similairement :

$$\frac{(\vec{D} + \vec{M}')^2 - M'^2}{(\vec{D} + \vec{M}')^2} = 1$$

ce qui revient à cette condition :

$$M'^2 = 0$$

Comme M'^2 ne saurait être nul puisqu'il faut tout de même éclairer la préparation, force est de faire intervenir au niveau de la lame de phase un facteur T tel que

$$T \cdot M^2 = 0$$

auquel cas l'expression équivaut à

$$\frac{(\vec{D} + \sqrt{-T} \cdot \vec{M}')^2}{(\vec{D} + \sqrt{-T} \cdot \vec{M}')^2} = 1$$

Le contraste est identiquement unitaire, mais comme $T = 0$, le fond est noir.

Nous retrouvons ici le mode de fonctionnement bien connu du fond noir classique où seule la composante diffractée participe à la formation de l'image. Dans ce cas, la notion de relation de phase entre M' et D n'a plus de sens, seule l'une des composante persistant après suppression de l'autre.

Le contraste maximum est donc étroitement lié à l'une des conditions suivantes, ou bien :

$$T = 0$$

et il s'agit du fond noir sur lequel il est inutile de s'arrêter longuement, ou bien :

$$T \cdot M'^2 = D^2$$

c'est-à-dire

$$\sqrt{-T} \cdot \vec{M}' = -\vec{D}$$

(en tenant compte du déphasage au niveau de la lame).

Pour des raisons de commodité d'écriture, les calculs qui vont suivre comporteront les artifices de notation suivante :

1° Nous écrivons :

$$\sqrt{T} = \Theta$$

2° Afin de ne pas introduire de nombre complexe dans les calculs, l'absorption sera considérée séparément du déphasage. (On pourrait naturellement considérer la zone conjuguée de la lame de phase comme affectée d'un coefficient iT où i est le symbole des imaginaires et représente le déphasage de $\pi/2$).

Ces considérations sur le contraste maximum amènent aux conclusions suivantes :

Ou bien l'objet apparaît noir sur fond clair et alors le facteur Θ doit vérifier la relation

$$\overset{\rightarrow}{\Theta} \overset{\rightarrow}{M'} = - \vec{D}$$

Ou bien l'objet apparaît clair sur fond noir et

$$\Theta = 0$$

En contraste de phase proprement dit, le contraste maximum ne pourra être obtenu que lorsque l'objet apparaîtra noir sur fond clair. L'inverse ne peut être obtenu que par le fond noir classique, qui apparaît ainsi comme un cas particulier de la méthode de Zernicke. Ceci ne veut pas dire que cette deuxième éventualité soit dépourvue de signification pour le cas qui nous occupe. En effet un contraste maximum n'est pas une condition absolue d'utilisation et nous verrons que dans le cas de contrastes intermédiaires, qui sont du reste le plus souvent utilisés, l'objet peut utilement être rendu visible de l'une ou l'autre manière, soit plus sombre, soit plus clair que le fond.

CHAPITRE III

CONTRASTE DE PHASE DANS LES CAS GENERAUX

a) Cas d'un objet quelconque

Toute la partie précédente de cet exposé a été basée sur une hypothèse simplificatrice, à savoir :

l'objet est d'épaisseur e négligeable,

son indice n_p diffère peu de l'indice du milieu environnant n_m , ce qui revient à admettre un trajet optique très peu différent entre l'objet et le milieu, même à l'échelle de la longueur d'onde de la lumière.

Dans ces conditions, il a été possible d'admettre que l'onde diffractée était déphasée de 90° ($\varphi_d = \pi/2$) et que la zone conjuguée déphasant à son tour de la même valeur (au signe près), pouvait ramener les 2 fractions M' et D en concordance ou en opposition de phase de façon à obtenir une résultante aussi différente que possible en amplitude de l'une ou de l'autre de ces composantes.

Mais pratiquement, l'épaisseur de l'objet étant rarement négligeable et les conditions expérimentales imposant des valeurs déterminées de n_p et n_m , le trajet optique différentiel $e \cdot (n_p - n_m)$ pourra prendre des valeurs assez élevées et impossibles à négliger.

Il en résultera donc :

un déphasage de D différent de $\pi/2$,

une intensité de D atteignant des valeurs considérables.

A priori donc, l'emploi d'une lame de phase $\pi/2$ sera incorrecte et les deux composantes n'ayant pas leurs vecteurs coaxiaux (reliquat de déphasage) après sa traversée, leur résultante sera d'amplitude différente de leur somme algébrique prévue théoriquement.

Le contraste en conséquence ne pourra jamais atteindre l'unité quelle que soit la valeur du paramètre T (ou Θ).

Si l'on tient absolument à respecter la relation $K = 1$, force est donc d'utiliser une lame de phase déphasant l'onde D de la valeur

$$\pi - \varphi_d$$

soit autant de valeurs possibles que d'objets à examiner.

Pour des raisons pratiques, ceci est impossible avec les systèmes optiques usuels, et comme le facteur T est lié à φ_p donc à φ_d les équations du contraste maximum ne seront jamais satisfaites.

Il est donc très important de pouvoir déterminer dans l'utilisation d'une lame de phase standard déphasant de $\pi/2$ la valeur à attribuer à T en fonction du travail à réaliser.

b) Rappel des relations entre D, M, φ_d et φ_p

Soit un objet d'épaisseur e, d'indice n_p , monté dans un milieu m d'indice n_m .

Le trajet optique au niveau de l'objet différera de celui correspondant au milieu de la valeur

$$\Delta = e (n_p - n_m)$$

Le déphasage de la composante P sera

$$\varphi_p = \frac{2 \pi \Delta}{\lambda}$$

Le déphasage de la composante diffractée sera :

$$\varphi_d = \frac{\pi}{2} + \frac{\varphi_p}{2}$$

Notons que quelle que soit la valeur de φ_p , obligatoirement :

$$\frac{\pi}{2} \leq \varphi_d \leq \frac{3 \pi}{2}$$

L'amplitude de P est par hypothèse égale à celle de M puisque l'objet est incolore et transparent .

L'amplitude de D a pour valeur :

$$\vec{D} = \vec{M} \cdot 2 \sin \frac{\varphi_p}{2} = \vec{M} \cdot 2 \sin \frac{\pi \Delta}{\lambda}$$

Toutes ces égalités mettent en évidence les relations d'interdépendance entre les amplitudes, les phases des composantes et le trajet optique au niveau de la préparation. Les valeurs des déphasages étant fonction de e et de n_p , il en résulte que si l'un ou l'autre paramètre (ou les deux) prend des valeurs élevées, l'hypothèse simplificatrice devient de moins en moins adéquate.

Il est donc intéressant d'étudier les corrélations et les optima à adopter dans les cas généraux.

c) **Contraste maximum dans les cas généraux**

L'utilisation systématique de lames de phase standard est difficilement évitable. Il est impossible pratiquement d'être en possession de lames de phase dont les valeurs de déphasage correspondent à tous les cas prévus et les dispositifs à déphasage variable que nous étudierons sommairement par la suite ne sont pas, à l'heure actuelle, disponibles dans le commerce. En leur absence, la seule liberté (toute relative du reste) est le choix de la valeur du coefficient de transmission T de la zone conjuguée. Un choix judicieux de celui-ci, permet de pallier dans une certaine mesure l'approximation du déphasage et d'obtenir un contraste élevé nécessaire dans certains cas.

Précisons à nouveau la notion suivante :

L'énergie d'une vibration lumineuse est fonction du carré de son amplitude.

Le contraste s'exprime donc par :

$$K = \frac{M^2 - (\vec{M} + \vec{D})^2}{M^2}$$

L'interposition de la lame de phase $\pi/2$ ayant un coefficient de transmission $T = \Theta^2$ transformera, si l'on considère la phase de D relative à celle de M :

$$\vec{M} \quad \text{en} \quad \vec{M} \cdot \Theta$$

$$\vec{D} \quad \text{en} \quad \vec{D}' = \vec{D} \left(\sin \pm \frac{\varphi_D}{2} \right) \text{ soit}$$

$$\vec{M} \cdot (2 \sin \left[\frac{\varphi_d}{2} \pm \frac{\pi}{2} \right])$$

Il en résulte :

$$K = \frac{(\vec{M} \cdot \Theta)^2 - (\vec{M} \cdot \Theta + \vec{D}')^2}{(\vec{M} \cdot \Theta)^2}$$

1. — **PREMIER CAS : L'OBJET DOIT APPARAÎTRE PLUS SOMBRE QUE LE FOND (CONTRASTE SOMBRE).**

Le contraste optimum correspondra à la valeur minimum de

$$(\vec{M} \cdot \Theta + \vec{D}')^2$$

Cette expression a pour valeur développée :

$$(\vec{M} \cdot \Theta + \vec{D}')^2 = M^2 : (\Theta^2 - 2 \cos \varphi_d' \pm 2 \Theta \sin \varphi_d')$$

Le second membre affecte la forme d'un trinome du second degré dont il est facile de démontrer l'absence de racine réelle, qui exigerait :

$$(\cos \varphi_a' - 1)^2 < 0$$

L'impossibilité saute immédiatement aux yeux.

Dans le cas où cette dernière expression serait nulle, il existerait une racine double :

$$\begin{aligned} (\cos \varphi_a' - 1)^2 &= 0 \\ \varphi_a' &= k \pi \end{aligned}$$

π

ce qui suppose avec une lame $\pm \frac{\pi}{2}$ une valeur de D telle que :

$$\varphi_d = 2 k \pi \pm \frac{\pi}{2}$$

soit une onde diffractée déphasée de $\frac{\pi}{2}$ par rapport à l'onde transmise. C'est l'hypothèse simplificatrice dont nous retrouvons les conclusions théoriques.

Remarquons immédiatement que le minimum de $(\vec{M} \cdot \Theta + \vec{D}')^2$ a toujours pour condition :

$$\Theta = \pm 2 \sin \varphi_a'$$

Valeur pour laquelle la dérivée de $(\vec{M} \cdot \Theta + \vec{D}')^2$ s'annule lorsque Θ varie, ce qui revient à écrire

$$T = \Theta^2 = 4 \sin^2 \varphi_a' = 4 \sin^2 \frac{\varphi_D}{2}$$

Le contraste optimum pour un objet déterminé suppose donc une valeur très précise de T, déterminée par les caractères optiques de cet objet et du milieu de montage.

Ceci explique les différences observées dans l'aspect des images fournies par des préparations où ne varie que le milieu de montage.

Il faut remarquer en effet que :

$$\varphi_D = \frac{2 \pi \Delta}{\lambda} \quad \text{et} \quad \Delta = e (n_D - n_m)$$

et à la fin du compte :

$$T = 4 \sin^2 \frac{e (n_D - n_m)}{\lambda}$$

En corollaire, il est évident que pour une valeur de T donnée, il est possible de rétablir l'égalité ainsi définie en modifiant la valeur de l'indice n_m du milieu de montage si les caractéristiques de l'objet sont connues.

De même, il est possible d'ajuster cette égalité en jouant sur la longueur d'onde de la lumière utilisée.

II. — SECOND CAS : L'IMAGE DOIT ÊTRE PLUS CLAIRE QUE LE FOND (CONTRASTE CLAIR).

A ce cas correspond, à la limite, le fond noir classique. Les inconvénients de ce système sont bien connus. D'une part, il donne des rapports de luminance difficiles à apprécier entre les éléments constitutifs d'un même objet, et seuls les contours sont réellement bien visibles. D'autre part, la structure de l'image est assez fortement perturbée du fait de la suppression complète de la fraction transmise.

La notion de contraste optimum correspond donc ici à une valeur assez arbitraire, compromis entre le contraste et la finesse des détails observables.

On admet généralement comme contraste optimum la relation :

$$D'^2 = 4 M^2 \Theta^2$$

soit :

$$\vec{D}' = 2 \vec{M} \cdot \Theta$$

Et dans ce cas, par des calculs analogues à ceux cités pour le premier cas (contraste sombre) :

$$T^2 = \Theta^2 = 4 \sin^2 \frac{\varphi_D}{2}$$

soit la même expression que dans le premier cas, avec les mêmes conclusions.

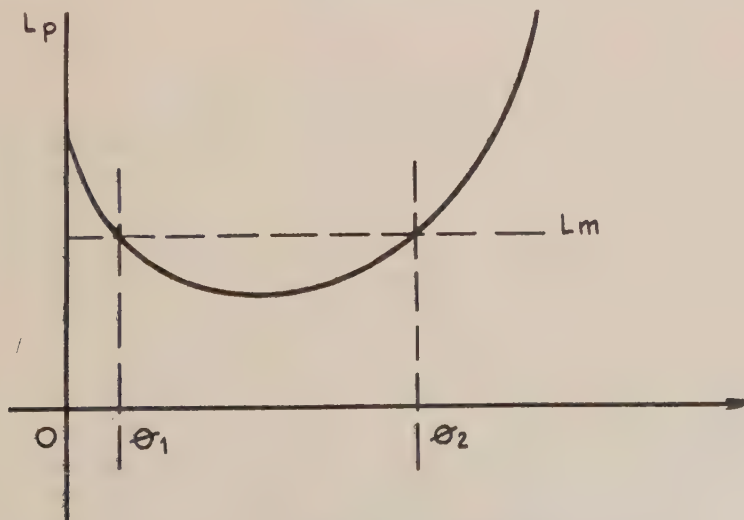


Fig. 11. — Luminance de l'objet en fonction de Θ .
 L_p = Luminance de l'objet, L_m = Luminance du fond.

III. — DISCUSSIONS DE CES RÉSULTATS

Un coefficient de transmission est obligatoirement compris entre 0 et 1, valeurs correspondant respectivement à une absorption nulle (transparence totale) et une absorption totale (opacité) d'où

$$0 \leq 4 \sin^2 \frac{\varphi_D}{2} \leq 1$$

La première inégalité

$$4 \sin^2 \frac{\varphi_D}{2} \geq 0$$

n'apporte aucune difficulté, elle est en effet toujours vérifiée.

La seconde inégalité

$$4 \sin^2 \frac{\varphi_D}{2} \geq 1 \text{ équivaut à :}$$

$$\left| \sin \frac{\varphi_D}{2} \right| \leq 0,5 \text{ c.a.d.}$$

$$\left| \frac{\varphi_D}{2} \right| \leq \frac{\pi}{6} \text{ soit encore } \left| \varphi_D \right| \leq \frac{\pi}{3} \text{ à } 2 \text{ k } \pi \text{ près}$$

Cette condition n'est pas forcément remplie, le déphasage dû à l'objet pouvant être absolument quelconque. Dans ce cas, le calcul donne pour T une valeur supérieure à 1 et simultanément, puisque :

$$\vec{D} = \vec{M} 2 \sin \frac{\varphi_D}{2}$$

$|D|$ devient plus grand que $|M|$

C'est l'onde diffractée qui est trop forte et qu'il faut affaiblir. Dans ce cas, ce sera la zone complémentaire qui sera rendue absorbante et non plus la zone conjuguée.

Ce type de lame de phase est en général peu connu des utilisateurs, surtout biologistes, bien que certaines préparations puissent éventuellement en justifier l'emploi. Nous les signalerons en temps utile.

d) Effets dus à la longueur d'onde de la lumière

Jusqu'à présent il n'a pas été précisé quel pouvait être l'effet de variations dans la composition spectrale de la lumière incidente. Il a été admis implicitement que cette longueur d'onde pouvait être quelconque, bien que dans les formules et calculs, la valeur de λ influait sur le résultat. Nous allons préciser dans quelle mesure.

Si l'emploi en microscopie d'une source monochromatique est possible, le plus souvent, il est fait usage de lumière blanche. La valeur de λ n'est donc pas déterminée et varie d'une façon en général continue dans les limites du spectre utilisé.

Il en résulte une infinité de valeurs de φ_d selon :

$$\varphi_d = \frac{\pi}{2} + \frac{\pi e (n_p - n_m)}{\lambda}$$

Le contraste en lumière blanche sera donc la résultante des effets élémentaires du système optique sur chaque image correspondant à une composante de longueur d'onde déterminée.

Il est facile d'en conclure que dans le cas d'une préparation donnée, un appareillage déterminé pourra fournir une image dont le contraste sera optimum pour une valeur donnée de λ bien précise, d'où l'emploi éventuel comme source lumineuse d'un monochromateur ou de tout système de filtres.

Le calcul du contraste en fonction de la valeur de λ est très possible, mais toutefois assez long si l'on veut tenir compte des dispersions de l'objet, de la lame de phase.. qui font varier les indices de réfraction en même temps que φ_p .

On peut à la rigueur négliger l'effet de dispersion, surtout avec les lames de phase utilisées couramment et qui sont rendues « achromatiques », c.a.d. dont les caractéristiques varient peu avec λ .

On sait toutefois que cet achromatisme, comme celui du reste de tout système dioptrique, n'est qu'une approximation, assez satisfaisante certes, mais limitée à deux régions du spectre, dans le bleu et le jaune en général.

L'emploi de lumière blanche fera baisser le contraste prévu lors des calculs de la manière suivante (nous négligerons les pouvoirs dispersifs des substances traversées tant au niveau de l'objet qu'au niveau de la lame de phase) :

Admettons que la lame de phase soit correctement achromatisée et qu'elle déphase uniformément de $\frac{\pi}{2}$ tout le long du spectre.

Nous savons déjà que le contraste optimum est réalisé pour une valeur donnée de φ_d dont dépend le facteur T. Si ce dernier est lui-même fixé par construction, le contraste sera fonction de λ .

Le spectre usuel de la lumière blanche s'étend à peu près de 400 m μ pour le violet à 700 m μ pour le rouge. Admettons que l'objet examiné produise un déphasage de l'onde D correspondante de 0,6 π pour la raie verte du mercure $\lambda = 546,1$ m μ .

Aux extrémités du spectre, les déphasages seront, pour le rouge et le violet, respectivement de $0,57 \pi$ et de $0,64 \pi$. Si le coefficient de transmission de la zone conjuguée a été calculé pour la valeur de $0,6 \pi$ on voit que l'utilisation de la lumière blanche ne pourra que faire baisser le contraste, qui sera de

1	pour	546,1 m μ	(raie verte du Hg)
0,88	pour	700 m μ	(rouge extrême)
0,81	pour	400 m μ	(région violette)

Ces valeurs peuvent paraître peu différentes, et pour les objets très visibles correspondant effectivement à ces calculs, la différence est peu appréciable à l'œil. Mais dans les cas d'objets très petits et donnant un contraste très faible avec la même lame, la perte de contraste dans les régions extrêmes du spectre est très gênante et on a tout intérêt à obtenir le meilleur contraste possible. Une perte de contraste de 10 % est acceptable avec des objets faciles à voir et assez gros. Avec des particules très peu contrastées et à la limite de visibilité, une telle baisse de contraste les noie dans le fond et elles cessent d'être perceptibles. Il y a donc intérêt à utiliser une lumière monochromatique ou presque, obtenue grâce à un monochromateur ou des jeux de filtres appropriés.

e) Effet du trajet optique

L'énergie correspondant à l'image est donnée par la relation déjà étudiée.

$$(\vec{M} \Theta + \vec{D}')^2 = M^2 \left(\Theta - 2 \sin \frac{\varphi_D}{2} \right)^2$$

L'énergie lumineuse correspondant au fond est naturellement constante, puisque nous supposons ici que les variations intéressent seulement le trajet optique de l'objet. La représentation sur un même graphique des intensités lumineuses (*fig. 12*) de l'image et du fond prend l'aspect ci-contre (premier graphique). La luminance de l'objet en fonction de

$\sin \frac{\varphi_D}{2}$ varie suivant la courbe représentative en arc de parabole, bornée

par les valeurs limites de $\sin \frac{\varphi_D}{2}$. Elle passe par un minimum pour

$\sin \frac{\varphi_D}{2} = \Theta/2$, et coupe la droite représentant la luminance du fond

en 2 points pour lesquels $\sin \frac{\varphi_D}{2}$ est respectivement égal à 0 et à Θ .

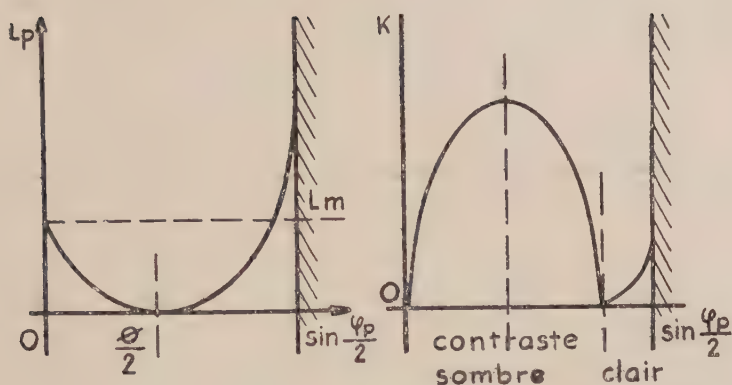


Fig. 12

En ces valeurs, le contraste sera nul (égalité des luminances). Entre ces valeurs, l'image apparaîtra sombre sur un fond plus clair, avec le maximum de contraste signalé. En dehors de ces valeurs, on aura un contraste clair.

La représentation graphique du contraste correspondant est donnée par la seconde courbe. Nous avons tenu compte de la définition arithmétique du contraste qui doit rester compris entre 0 et 1. Il y a donc lieu de considérer la fonction $K = f(\Theta)$ soit, pour le contraste clair :

$$K = \frac{\vec{(M \Theta + D')^2} - \vec{(M \Theta)^2}}{\vec{(M \Theta + D')^2}}$$

au lieu de la formule utilisée pour le contraste sombre

$$K = \frac{\vec{(M \Theta)^2} - \vec{(M \Theta + D')^2}}{\vec{(M \Theta)^2}}$$

Ce qui introduit évidemment une complication supplémentaire dans l'aspect de la courbe, les points de rebroussement correspondant à une inversion du contraste.

Un simple examen qualitatif de la courbe correspondant au contraste permet de se rendre compte des phénomènes suivants. Pour une lame

de phase donnée, le déphasage $\frac{\pi}{2}$, et de coefficient Θ au niveau de

sa zone conjuguée, le contraste est clair pour toutes les valeurs négatives du trajet optique de l'objet par rapport à l'environnement. Lorsque

ce trajet optique croît, le contraste passe évidemment par une valeur nulle, puis croît (contraste sombre) jusqu'au maximum déjà calculé lorsque :

$$4 \sin^2 \frac{\varphi_D}{2} = T = \Theta^2$$

décroît ensuite, et redevient nul pour

$$\sin^2 \frac{\varphi_D}{2} = \Theta^2$$

Enfin, pour toute valeur supérieure du trajet optique, on retrouve un contraste clair.

A noter que les courbes sont ici en fonction non du trajet optique lui-même, mais du sinus du demi-angle de déphasage. Il faut ainsi souligner que le phénomène est périodique et se retrouve pour la périodicité de 2π du déphasage.

Théoriquement, les mêmes phénomènes sont rigoureusement cycliques. En pratique, cependant, pour un déphasage supérieur à 2π , les aspects réapparaissent bien cycliquement, mais avec des modifications importantes dues à l'importance de la diffraction, l'objet prenant de plus en plus un aspect diffusant et produisant des effets de dispersion lumineuse incompatibles avec le fonctionnement correct des optiques. Comme à ces perturbations d'amplitude sont associées des modifications de phase considérable, l'image devient inobservable. Il n'est donc pas utile de s'étendre longuement sur ces particularités, que l'on rencontre toutefois dans l'observation courante. C'est par exemple le cas des hématies observées en milieu aqueux, ou les valeurs élevées du trajet optique différentiel ne permettent pas d'obtenir d'image de qualité sans précaution spéciale.

Si le trajet optique est assez grand, on sait qu'un microscope usuel fournit une image facilement visible de particules transparentes, en soulignant ses contours de cernes alternativement clairs et sombres, phénomène causé par les aberrations résiduelles des optiques imparfaitement corrigées.

Avec une optique à contraste de phase, on retrouvera ce même effet de cerne dont le mécanisme est identique, avec en plus un effet d'aspect comparable dû, non plus aux aberrations influençant les répartitions énergétiques mais bien les aberrations de phase dans le plan de l'image.

Le bord de l'objet examiné sera donc constitué par une alternance plus ou moins serrée de bandes claires et sombres, dans un ordre variant avec le dispositif employé.

Cet effet de bord se voit surtout avec les optiques à fort contraste (facteur T faible) et dans le cas de valeurs trop grandes du trajet optique différentiel. L'emploi d'un milieu de montage dont l'indice de réfrac-

tion se rapprochera plus de celui de l'objet atténuera cet effet indésirable.

f) Effets dus au système optique

La théorie prévoit, d'après les caractéristiques optiques de l'objet et du milieu, des aspects extrêmement variés des images pour lesquelles les différentes valeurs du facteur Θ apportent encore des modifications de détail.

Il a été déjà indiqué que, pour une préparation déterminée, le sens du déphasage dû à la lame de phase avait pour effet de donner une image de la particule observée soit plus claire, soit plus sombre que le fond, et ce, avec un contraste variant avec le facteur Θ .

Un objet biologique, cellule vivante ou fixée, est constitué de structures élémentaires ayant leur indice de réfraction et leur épaisseur propre. Leur trajet optique est de ce fait parfaitement défini et en général fort différent de celui des structures voisines. L'indice de réfraction du milieu de montage influant sur le déphasage local correspondant, peut dans certains cas le compenser exactement, ou du moins suffisamment pour en faire disparaître l'image.

Dans d'autres cas, le remplacement de ce milieu par un autre d'indice différent, fera réapparaître des structures, mais en modifiant le contraste d'autres éléments, ou même l'inverser totalement.

Cette cause de modification dans l'aspect de l'image est fort intéressante à connaître et explique certains aspects inattendus rencontrés parfois.

§ : Variations du facteur T .

Ainsi qu'il a été exposé, la nature de la lame de phase est d'un effet capital sur les aspects observés. L'emploi d'un facteur de transmission différent modifie les contrastes. Dans ce cas, certaines structures élémentaires peuvent devenir pratiquement invisibles tandis que d'autres verront leur contraste fortement modifié.

Si l'on reprend les calculs relatifs à l'expression du contraste en fonction des caractéristiques de la lame de phase et plus particulièrement T , on sait que pour

$$T = 4 \sin^2 \frac{\varphi_D}{2}$$

le contraste est maximum pour l'objet correspondant au déphasage φ_D . Ceci provient du fait que la résultante des ondes directes M , Θ et D' est à ce moment minimum, le vecteur représentant leur sommes est le plus petit possible.

Pour cet objet pris comme cas précis, le contraste augmente donc lorsque T passe de 1 à cette valeur précise.

Lorsque T continue à décroître, le contraste va naturellement diminuer, car le vecteur $M \Theta + D'$ croît. Ce phénomène est évident d'après la formule développée de $M \Theta + D'$ (ou plutôt de son carré) exposée p. 35. La luminance correspondant à cette somme est bien une fonction quadratique de Θ . Si l'on considère simultanément les luminances du fond $(M \Theta)^2$ et de l'objet $(M \Theta + D')^2$ selon le graphique p. 37, il existe deux points où les valeurs de ces luminances sont égales, par conséquent où le contraste est nul. Un calcul quantitatif exact est possible mais il nous paraît inutile de l'exposer ici. Ces deux points Θ_1 et Θ_2 correspondent à l'intersection des deux courbes représentatives. Pour les valeurs supérieures de Θ , on voit immédiatement que la luminance de l'objet est supérieure à celle du fond : le contraste s'inverse. La conclusion est donc la suivante : pour un objet déterminé, le contraste s'inverse lorsque la valeur de Θ sera suffisamment faible, c'est-à-dire lorsque la zone conjuguée deviendra très absorbante. Un objet de trajet optique élevé ou moyen sera donc éventuellement vu en contraste clair avec une lame prévue pour donner un contraste sombre des particules de faible trajet optique.

On se souviendra donc que le contraste varie énormément avec Θ , et par conséquent avec T , cette variation pouvant aboutir d'un contraste maximum sombre à un contraste nul et même à une inversion du dit contraste.

§§ : *Effet des variations du déphasage au niveau de la lame.*

Ce facteur est évidemment très important théoriquement puisque le sens de ce déphasage commande le sens du contraste. Néanmoins, les valeurs de ce contraste sont assez peu critiques, et dans les cas les plus fréquents, une variation du déphasage autour de la valeur réalisée de façon standard ne change guère les résultats obtenus.

Pour illustrer ce fait, le tableau suivant (emprunté à [14]) permet de chiffrer les modifications dues aux variations du trajet optique de l'objet, le contraste maximum étant rétabli par une valeur appropriée de Θ :

Θ	T	φ_D degrés	$(M \Theta)^2$	$(M \Theta + D')^2$	K
0,1	0,01	5,72	0,01	0,000.024.8	0,998
0,2	0,04	11,32	0,04	0,000.392	0,990
0,3	0,09	16,70	0,09	0,001.94	0,978
0,4	0,16	21,80	0,16	0,005.93	0,963
0,5	0,25	26,57	0,25	0,013.9	0,944
0,6	0,36	30,97	0,36	0,027.6	0,923
0,7	0,49	35,0	0,49	0,048.7	0,901

On voit donc que d'après ce tableau, une lame de phase standard quant à son déphasage pourra être utilisée pour des objets de trajets optiques assez élevés sans que le contraste en souffre beaucoup (moins de 10 % pour un déphasage de 35°) pourvu que le coefficient de transmission T soit correctement calculé pour le trajet optique considéré.

Le sens du déphasage qui peut être positif ou négatif, c'est-à-dire produisant une avance ou un retard de phase de la fraction diffractée, influe d'une façon différente, puisqu'il inverse le contraste, transformant par exemple une image déterminée en son homologue négatif, d'une façon très comparable à l'inversion photographique. Les valeurs du contraste ne sont pas modifiées, tant que le facteur T ne change pas, lorsque l'on substitue une lame à déphasage positif à son équivalent négatif. L'effet peut tout au plus, dans certains cas particuliers, produire une facilité d'observation plus ou moins grande, mais sans qu'aucun détail supplémentaire n'apparaisse.

g) **Contraste positif, contraste négatif**

Un objet donné fournissant en contraste de phase, soit une image claire sur un fond sombre, soit une image inverse, les aspects possibles sont donc équivalents à ceux d'un négatif photographique et à l'épreuve positive qui lui correspond.

Dans le cas de la photographie, on appelle positive toute image dont les variations de luminance ou de réflectance sont dans le même sens que celles de l'objet correspondant. L'appellation ne souffre donc pas d'ambiguïté.

En contraste de phase, au contraire, les termes « positif » et « négatif » ne peuvent résulter que d'une convention puisque :

1° la différence de luminance entre l'objet et le reste du champ est le plus souvent nulle (objet transparent);

2° au niveau de l'image, le contraste clair ou sombre dépend à la fois du sens du trajet optique de l'objet, supérieur ou inférieur à celui du milieu, et du signe du déphasage de la lame;

3° une inversion simultanée des signes du trajet optique et du déphasage de la lame ne change pas le contraste de l'image alors que si le signe d'un seul d'entre eux est changé, le contraste se trouve inversé.

Il ne faut donc pas attacher à ces termes de « positif » et « négatif » d'autre valeur que celle d'une commodité de désignation. Les opticiens admettent que, dans un montage comprenant une préparation et une lame de phase, seule la seconde possède des caractères précis. La convention est alors la suivante :

— Si la lame de phase retarde les vibrations directes, c'est-à-dire si la zone conjuguée possède un trajet optique supérieur à celui de la zone complémentaire, le système est dit *négatif*. Comme il s'agit de rela-

tion de phase, ceci équivaut à une avance des vibrations diffractées. Nous retrouverons cette notion dans la classification des lames de phase, en particulier dans la classification de Bennett [14, 12].

— Si les phénomènes sont inversés, le système est dit positif.

Le premier type de lame fournit une image où la particule observée apparaît en sombre sur fond clair, si son trajet optique est supérieur à celui du milieu d'une valeur comprise entre 0 et $\lambda/2$, et le contraste est dit positif. Toutes choses égales d'ailleurs, le second type fournit un contraste dit négatif.

On voit donc ainsi la complexité de notation qui résulte de cette cascade de conventions, sans gros intérêt pour l'utilisateur. Aussi, dans le cours de cet ouvrage, les termes positif et négatif seront-ils volontairement abandonnés. Nous parlerons de contraste clair ou sombre, quel que soit le montage et l'objet examiné, en ne nous basant que sur l'aspect définitif de l'image. Il en résultera une terminologie sans ambiguïté, applicable à tous les cas sans exception et permettant une description beaucoup plus claire des effets obtenus.

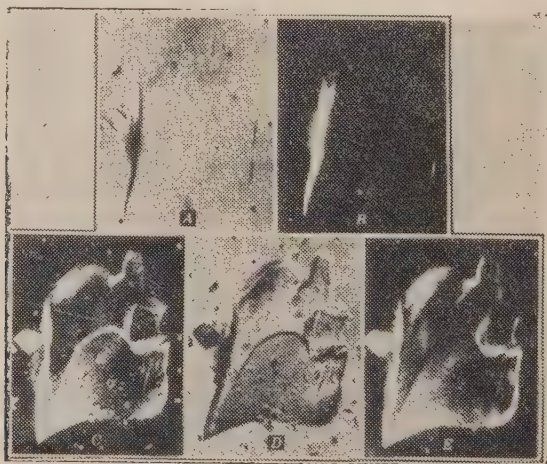


Fig. 13. — *Fragment de verre dans le baume.*
a) *fond clair*, b) *fond noir*, c) *contraste clair*,
d) *contraste sombre*, e) *négatif photographique de d.*

h) Sensibilité de la méthode

L'obtention d'une image contrastée à partir d'une préparation à peu près uniformément transparente est un avantage qualitatif énorme. Il vaut la peine de rechercher si, quantitativement, on peut atteindre ainsi des structures normalement invisibles avec les appareils classiques. Autrement dit, quelles sont les limites de dimensions des objets permettant encore une image utilisable.

Deux aspects du problème sont à comparer séparément, l'un relatif à la définition transversale (pouvoir séparateur), l'autre concernant la définition en profondeur ou en trajet optique (définition longitudinale), ce dernier point étant particulier au contraste de phase.

I. — DÉFINITION TRANSVERSALE.

Le montage à contraste de phase ne différant du montage classique que par la présence de la lame déphaseuse, il n'existe aucune raison *a priori* de lui supposer un pouvoir séparateur supérieur.

Le pouvoir séparateur d'un objectif parfait est donné par la formule :

$$\frac{1,22 \lambda}{2 n \sin u}$$

ou u est le demi-angle d'ouverture du cône lumineux et n l'indice de réfraction du milieu ambiant. L'expression $2 n \sin u$ est l'ouverture numérique de l'objectif.

Ce pouvoir séparateur théorique n'est naturellement jamais atteint. Tout d'abord, il concerne une utilisation en lumière rigoureusement monochromatique d'un objectif rigoureusement dénué d'aberrations, ce qui n'est jamais le cas. En second lieu, l'importance des anneaux de diffraction (disque d'Airy) d'un bon objectif gêne la visibilité d'une particule peu éclairée ou peu lumineuse située au voisinage d'un objet très brillant. On préfère ainsi modifier l'allure de l'image de diffraction en atténuant les anneaux, ce qui a pour effet d'élargir la tache centrale, d'où perte de définition. Ce traitement particulier de l'objectif correspond à l'apodisation.

La présence de la lame de phase dans un objectif modifie naturellement la figure de diffraction en élargissant la tache centrale et en augmentant légèrement l'intensité des anneaux. Si déliée que soit la zone conjuguée (et on ne peut aller très loin dans cette voie), l'interception de lumière diffractée se fait ainsi sentir. Sans entrer dans des calculs assez complexes et longs [39, 40], on peut affirmer que la méthode fournit théoriquement au plus une définition équivalente à la microscopie classique. Dans la pratique, il existe une perte de définition assez variable selon les montages, peu importante quoique déjà visible, surtout avec des objectifs à fort grossissement employés en fond clair classique. Les objectifs à contraste de phase à immersion, par exemple, fournissent, en utilisation avec un condenseur pour fond clair, une image nettement moins bonne que le même objectif sans lame de phase.

II. — DÉFINITION LONGITUDINALE.

Ici, le problème est très différent. Le microscope classique ne peut donner d'image interprétable d'objets transparents et incolores que pour

des trajets optiques différentiels élevés, et ce, grâce aux résidus d'aberration favorisés par les artifices tels que l'éclairage oblique, la défocalisation ou la diminution de l'ouverture numérique par fermeture du diaphragme du condenseur.

N'ayant pas besoin de ces artifices, le contraste de phase utilise pour produire des différences d'amplitude les déphasages créés par toute différence locale de trajet optique, qui existent si petite soit l'irrégularité.

Le calcul des limites de visibilité est simple.

Puisqu'il s'agit des limites inférieures, il est légitime d'admettre que la composante diffractée D est déphasée de 90° , en négligeant les reliquats de déphasage après traversée de la lame de phase. Par ailleurs, le résultat dépendra de la sensibilité différentielle du récepteur utilisé (œil, pellicule photographique, convertisseur électronique).

Dans le cas de l'œil l'influence de l'éclairement moyen, du gradient de contraste au point observé, dans le cas de l'émulsion photographique la sensibilité de l'émulsion et son « contraste » seront des facteurs de modification des résultats. Les calculs qui vont suivre n'ont d'autre prétention que de fournir un ordre de grandeur, et nous nous limiterons à l'observation visuelle pour laquelle les facteurs expérimentaux sont moins nombreux.

Le seuil différentiel de l'œil est, en fonction de la luminance ambiante (Pieron).

L (apostilbs)	0,1	1	5	20	200
Seuil diff.	0,133	0,081	0,05	0,03	0,022

En admettant une luminance assez faible mais courante de 20 apostilbs, et un contraste sombre (lame très absorbante).

$$\frac{T \cdot M^2 - D^2}{T \cdot M^2} > 0,03$$

soit, après transformation :

$$\frac{T - \sin^2 \frac{2 \pi e \cdot (n_p - n_m)}{\lambda}}{T} > 0,03$$

ou encore :

$$\sin^2 \frac{2 \pi e (n_p - n_m)}{\lambda T} > 1 - 0,03$$

D'après cette formule, plus T sera faible, plus le trajet optique et le déphasage correspondant pourront être petits.

Pour $T = 0,1$, valeur assez usuelle, le calcul donne un trajet optique à très peu près égal à $\frac{\lambda}{10}$ pour le contraste considéré.

Avec une lame très absorbante, $T = 0,01$, ce qui est encore réalisable, la visibilité correspondra à un trajet optique aux environs de $\frac{\lambda}{100}$.

Que représentent ces valeurs ? Supposons que la préparation consiste en fragments de verre immergés dans l'eau. On peut admettre les indices suivants :

$$n_p = 1,53$$

$$n_m = 1,33$$

Si l'examen est fait avec la lumière verte du Hg.

$$\lambda = 546,1 \text{ m}\mu$$

Les différences d'épaisseur à la limite de visibilité seront :

dans le premier cas de : $27,3 \text{ m}\mu$

dans le second cas de : $2,73 \text{ m}\mu$

La sensibilité atteint donc des valeurs absolument extraordinaires, rejoignant presque les possibilités du microscope électronique.

En ne tenant compte que du premier chiffre correspondant à une lame dont l'utilisation n'est pas exceptionnelle, on peut prétendre que les plus fines structures d'un cytoplasme cellulaire peuvent être rendues visibles.

i) Aspects de l'image en contraste de phase

Les conditions générales de la dimension de l'image étant établies il est nécessaire d'exposer brièvement l'aspect des objets à travers un microscope à contraste de phase qui, au contraire de la microscopie classique ne sont pas des agrandissements purs et simples de la préparation.

I. — PARTICULE RÉDUITE A UN POINT.

C'est le cas le plus simple, représenté par exemple par les microbes soit plus réfringente que le milieu de montage. L'onde P correspondante sera en avance de phase sur celle ayant traversé le milieu, soit :

$$\varphi_p = \frac{2 \pi \cdot e (n_p - n_m)}{\lambda}$$

ou encore :

$$\varphi_p = + \frac{\pi}{2}$$

Si la lame de phase fait intervenir une nouvelle avance de $+\frac{\pi}{2}$ la somme vectorielle des composantes correspondant à la particule donnera :

$$\vec{M} + \vec{D}' < \vec{M}$$

et dans ce cas la particule apparaîtra moins brillante que le fond.

Si l'objet est au contraire moins réfringent que le milieu, l'onde lumineuse qui le traversera sera en retard de phase, soit :

$$\varphi_D = -\frac{\pi}{2}$$

Avec la même lame de phase que précédemment,

$$\vec{M} + \vec{D}' > \vec{M}$$

et dans ce cas, l'image de la particule sera plus brillante que le fond.

Les conclusions sont respectivement inversées dans le cas où la lame de phase retarderait la portion diffractée au lieu de l'avancer.

Il est ainsi immédiatement possible de se rendre compte qu'avec une lame de phase donnée, un même objet pourra apparaître plus clair ou plus sombre que le fond selon que le milieu de montage sera moins ou plus réfringent que l'objet observé.

II. — OBJET COMPLEXE.

Habituellement, l'observation microscopique porte sur des objets dont la complexité de structure est le but de l'examen. En l'absence de coloration, ces éléments structuraux sont caractérisés par leur taille, leur forme et, physiquement par leurs propriétés optiques individuelles, indice de réfraction et trajet optique. Si une cellule est constituée de particules élémentaires $p_1, p_2, \dots p_n$ ayant chacune leur indice propre, il en résultera que l'utilisation d'un milieu de montage déterminé, d'indice n_m précisément fortuitement égal à celui d'une des particules citées, aura pour effet de rendre ladite particule totalement invisible.

L'objet complexe type de cette étude étant la préparation biologique, des précisions s'imposent sur ce point particulier. Qu'il s'agisse de cellules ou de coupes tissulaires, *in vivo* ou *in vitro*, leur structure se caractérise optiquement par une suite complexe de gradients de trajets optiques, aux frontières irrégulières, d'amplitude très variable. Le problème se pose alors sous deux aspects : visibilité de la particule dans son ensemble au milieu du champ, et visibilité des structures internes de la particule considérée.

Les deux aspects ressortissent au même genre de phénomène, mais, si l'on veut, à deux échelles différentes.

La visibilité globale d'un élément cellulaire par exemple est due, surtout aux faibles grossissements, aux différences de trajet optique entre le cytoplasme (ou le noyau et le cytoplasme) d'une part, le milieu de montage d'autre part. Toutes les considérations générales sont transposables immédiatement à ce cas.

La visibilité des structures internes, dépendant des mêmes notions, est fonction en plus, des trajets optiques différentiels entre par exemple une vacuole et le reste du cytoplasme. Si l'épaisseur de la cellule considérée est constante, la visibilité de l'inclusion cytoplasmique ne dépend que de la différence entre son indice propre et celui du reste du protoplasme (en tenant compte, bien entendu, de l'épaisseur de l'inclusion). Tant que le milieu de montage ne change pas l'indice du cytoplasme, l'inclusion sera visible, même si fortuitement le reste de la cellule devient invisible dans le milieu choisi. Si, au contraire, comme c'est le cas général, l'inclusion induit une différence locale d'épaisseur dans la cellule qui la contient, un milieu de montage déterminé peut fortuitement arriver à compenser la différence de trajet optique correspondante, suffisamment pour la rendre peu ou pas visible, sur le fond cytoplasmique général, quelle que soit la visibilité de celui-ci.

Il y a donc encore là une cause d'erreur d'interprétation à connaître afin de l'éviter.

Enfin, comme il a été précisé, les valeurs élevées des différences de trajet optique produisent une image où des distorsions de phase importantes apparaissent, soulignant ainsi les accidents optiques de cernes complexes. On comprend que dans ce cas, l'image d'une préparation complexe comme le sont la majorité des préparations biologiques donne des aspects ininterprétables.

Il y a donc un intérêt primordial à éliminer dans la mesure du possible les causes de ce défaut. Anticipant sur les chapitres qui vont suivre, précisons que ceci est possible grâce à deux précautions :

Coupes ou préparations très minces.

Milieu de montage correct.

Quoi qu'il en soit, les images en contraste de phase sont toujours difficiles à interpréter, pour les raisons suivantes :

Tout d'abord, les contrastes observés, s'ils correspondent bien pour la plupart à des accidents de structure réels, ne sont pas sélectionnés, au contraire (en général) des techniques de coloration. On voit trop de choses à la fois, sans savoir quelles sont celles dont l'importance est primordiale.

D'autre part, les variations d'aspect avec les différents milieux utilisés peuvent induire en erreur dans certains cas.

Il est donc indispensable de subir un entraînement préalable si l'on veut éviter avec certitude des interprétations abusives.

DEUXIEME PARTIE

LES APPAREILS

Le contraste de phase est une méthode d'application très générale à tous les travaux où la microscopie est utilisée. Cependant, il ne sera pas question ici des systèmes appliqués à l'observation en lumière réfléchie, utilisés surtout pour le contrôle des surfaces, mais dont l'emploi en biologie est jusqu'à présent à peu près impossible. Nous examinerons seulement les réalisations utilisant les préparations transparentes.

CHAPITRE PREMIER

LES OBJECTIFS

Hormis la lame de phase dans les cas où celle-ci est incorporée à l'objectif, ceux-ci ne présentent pas de caractères spéciaux. On retrouve les systèmes à sec, à immersion homogène (huile) ou non homogène (eau, glycérine), en réalisation achromatique, apochromatiques, à fluorine, etc.

Leur utilisation ne nécessite que l'emploi du condenseur approprié avec son diaphragme. Il est du reste possible de les utiliser en observation ordinaire bien que la présence de la lame de phase nuise légèrement à leur pouvoir séparateur.

Les objectifs à contraste de phase des différents constructeurs correspondent à peu près aux séries standard, quant aux grossissements et aux ouvertures numériques.

Le gros obstacle au choix d'un objectif est l'uniformité assez générale des fabrications courantes. La grande majorité des catalogues ne comporte guère qu'une seule valeur de T et du déphasage par objectif. Il est donc difficile d'expérimenter sur le choix optimum pour un travail déterminé.

CHAPITRE II

LES LAMES DE PHASE

Élément essentiel de la méthode, leur réalisation doit répondre aux conditions déjà connues de déphasage et d'affaiblissement de la lumière transmise. Il existe plusieurs manières d'y satisfaire.

a) **Forme et constitution de la lame**

Ce n'est pas tellement la forme de la lame que la forme et les dimensions de la zone conjuguée qui importent. Le seul fait important est de superposer aussi exactement que possible la zone conjuguée et l'image de la source lumineuse (ou du diaphragme). Pourvu que cette condition soit respectée, le couple diaphragme-zone conjuguée peut être réalisé d'une manière absolument quelconque. Cet aspect du problème a déjà été étudié, nous n'insisterons pas.

De nombreuses réalisations pratiques de la lame de phase ont vu le jour depuis la découverte de la méthode, toujours basées sur un déphasage relatif entre les deux zones qui la constituent. Mais les auteurs ont souvent adjoint à ces propriétés des modalités particulières de construction permettant d'en faire varier les caractéristiques.

b) **Lame de phase à caractéristiques fixes**

I. — LAME DE PHASE DE ZERNIKE.

Cette lame est la plus simple possible. Sa structure essentielle est une petite lame de collodion *a* de forme et de taille correspondant à la zone conjuguée, montée dans le baume de Canada *b* entre 2 lames de verre à faces parallèles ou entre 2 lentilles d'un doublet d'objectif.

Si n est l'indice du collodion,

n' l'indice du baume

comme leur épaisseur E est indentique, on doit avoir :

$$E (n-n') = \frac{\lambda}{4}$$

pour que le déphasage résultant ait la valeur voulue. Comme il est possible de modifier quelque peu l'indice du baume par addition d'autres résines, il est immédiatement possible, après mesure de l'épaisseur et de l'indice de la lame de collodion, d'obtenir le milieu d'indice voulu et de réaliser la lame sans difficulté.

II. — LAMES DE PHASE OBTENUES PAR GRAVURE.

La zone conjuguée est constituée par un anneau (ou toute autre forme correspondant au diaphragme utilisé) gravé en creux ou en relief. La partie gravée en creux est remplie par une substance transparente d'indice différent de celui du support. Il en résulte comme pour le cas précédent, un déphasage relatif déterminé par un calcul identique. Selon que le trajet optique est plus grand ou plus faible au niveau de la zone conjuguée, le déphasage sera positif ou négatif.

III. — LAMES DE PHASES OBTENUES PAR ÉVAPORATION.

Dans les deux cas qui précèdent, il était assez difficile d'obtenir la régularité et le taux d'absorption voulus, les matériaux utilisés étant naturellement transparents.

La possibilité d'évaporer sous vide certains matériaux transparents (MgF_2 , AlF_3 , Na_3F_6 ...) ou opaques (métaux), et de provoquer leur dépôt sur les objets avoisinants, a permis une grande souplesse de réalisation. On provoque ainsi le dépôt d'un matériau dont l'épaisseur correspond au déphasage voulu. Ce dépôt affecte la forme désirée grâce à un système de caches et de pochoirs facile à imaginer.

En pratique la réalisation est faite en deux temps. On provoque tout d'abord le dépôt de la substance réfringente, puis le même procédé permet d'obtenir le dépôt de la couche absorbante faisant apparaître le coefficient T voulu. On tient naturellement compte du surcroît de déphasage provoqué par cette dernière si elle est épaisse. On obtient ainsi des lames de phase d'une grande régularité, et dont les caractéristiques peuvent être quelconques, mais malheureusement fixées une fois pour toutes et pouvant individuellement ne pas convenir à certains travaux.

Le support de la lame de phase est le plus souvent, à l'intérieur même de l'objectif, une des lentilles d'un doublet située convenablement dans le plan focal du système placé devant elle. Les modifications par rapport à un objectif classique sont donc minimes et peuvent facilement s'appliquer aux productions habituelles des constructeurs.

IV. — ACHROMATISME DE LA LAME.

Le problème consiste à obtenir un déphasage aussi régulier que possible et égal à $\frac{\pi}{2}$ tout au long du spectre lumineux, et ce surtout

pour l'observation d'objets très petits où le contraste, toujours assez faible risque d'être trop diminué, lors de l'emploi en lumière blanche de lames dont le déphasage varie trop avec la longueur d'onde.

Si l'objet à observer est d'indice supérieur au milieu de montage, pour un contraste sombre, la lame devra déphaser la lumière transmise de $+ 90^\circ$ conformément au schéma. Supposons que la lame doive être achromatisée pour les portions bleues (λ_1) et rouge du spectre (λ_2).

Soit : n_1 l'indice de la zone conjuguée à λ_1
 n_2 l'indice de la zone conjuguée à λ_2
 n'_1 l'indice de la zone complémentaire à λ_1
 n'_2 l'indice de la zone complémentaire à λ_2

On doit avoir simultanément :

$$E(n_1 - n'_1) = - \frac{\lambda_1}{4}$$

$$E(n_2 - n'_2) = - \frac{\lambda_2}{4}$$

Nous savons que les indices de réfractions sont plus grands pour les longueurs d'onde courtes.

soit :

$$n_2 = n_1 - d$$

$$n'_2 = n'_1 - d'$$

ou d et d' sont les dispersions des zones complémentaire et conjuguée. En portant les valeurs de d et d' dans les équations, on trouve :

$$d' - d = \frac{\lambda_2 - \lambda_1}{\lambda_1} (n_1 - n'_1)$$

Si le contraste doit être sombre, il faut

$$(n_1 - n'_1) < 0$$

Comme $\lambda_2 > \lambda_1$ on voit immédiatement que la dispersion de la zone conjuguée doit être supérieure à celle de la zone complémentaire. Les calculs numériques sont des applications directes de ces formules et le choix des matériaux réfringents est de ce fait immédiatement déterminé.

Naturellement, il ne s'agit que d'un achromatisme peu élaboré, mais on sait que les objectifs achromatiques ordinaires sont également traités pour la superposition de deux couleurs seulement. Il faut s'adresser aux objectifs apochromatiques pour avoir une superposition de trois couleurs et l'on sait la complexité de fabrication qui en résulte.

CHAPITRE III

SYSTEMES A CARACTERISTIQUES VARIABLES

a) Lames de phase spéciales

Les meilleures conditions d'observation sont déterminées par la constitution même de l'objet, et les caractères de la lame de phase qui en dérivent ne sauraient être valables dans tous les cas. Pour les objets difficiles à voir, la faiblesse des dimensions transversales ou longitudinales ne permet pas de se contenter d'une approximation vague sans risquer de perdre tout bénéfice de la méthode par un contraste trop faible.

En effet,

$$T = 2 \sin \frac{\varphi_d}{2}$$

peut prendre toutes les valeurs de 0 à 1, le déphasage de la lame

$$\varphi_1 = \frac{2 E. (n' - n)}{\lambda} = \pm \frac{\pi}{2}$$

n'est correct qu'à la limite théorique et pour une valeur donnée de λ .

Enfin, les diagrammes vectoriels et l'aspect théorique de la formation de l'image montrent l'intérêt qu'il y a au respect de la relation

$$\varphi_1 = k\pi - \varphi_d$$

auquel cas, la fraction diffractée est exactement en phase (pour k pair) ou en opposition de phase (pour k impair).

Ces différentes conditions ne peuvent être réalisées que pour un seul type de préparation, à moins de rendre variables les paramètres de la lame de phase, ou au moins l'un d'eux si l'on se contente de conditions optima simplement approchées.

I. — LAME DE PHASE DE TAYLOR.

Ce procédé utilise la polarisation rotatoire. On sait que certains corps optiquement anisotropes font tourner le plan de polarisation de la lumière et c'est le principe du dosage par polarisation de certains corps en solution (glucose par exemple).

Dans la réalisation de Taylor, le phénomène est utilisé de la manière suivante :

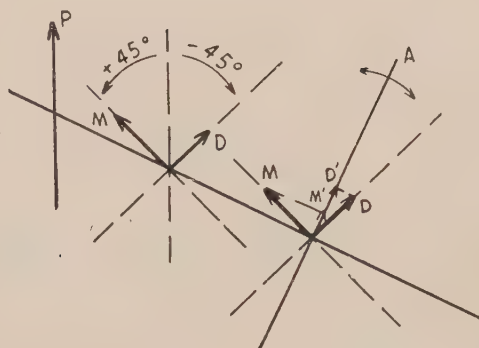


Fig. 14. — lame de phase de Taylor, marche de rayons.

La lumière incidente est polarisée rectilignement par un polaroïd ou tout autre système. Les phénomènes de diffraction n'en sont pas modifiés. La lame de phase comporte le système déphaseur habituel associé à une lame composée de 2 quartz, l'un déviant à droite le plan de polarisation et recouvrant par exemple la zone conjuguée, l'autre déviant ce même plan vers la gauche. La déviation est de 45° pour les deux éléments, mais en sens inverse. A la sortie de la lame de phase, les fractions directe et diffractée sont donc, en plus des modifications de phase habituelles, polarisées à 90° l'une de l'autre, mais dans ce cas, elles ne peuvent plus interférer, seules des vibrations polarisées parallèlement pouvant donner naissance au phénomène d'interférence.

On place à cet effet un polaroïd devant l'oculaire, et par rotation de ce dernier polariseur, le coefficient apparent de transmission de la zone complémentaire ou de la zone conjuguée varie.

Soit P la direction de polarisation des vibrations incidentes. Les vibrations diffractées, après traversée de la lame de Taylor, seront polarisées selon la direction D , la fraction transmise selon la direction M .

Si l'analyseur (polaroïd incorporé à l'oculaire) est en direction A , les vibrations M seront transmises sans affaiblissement, A étant parallèle à M . Par contre, les vibrations D , perpendiculaires seront arrêtées. L'image n'apparaîtra donc pas.

Si l'analyseur est disposé selon la direction B perpendiculaire à A , ce seront les vibrations transmises M qui seront arrêtées et les vibrations diffractées D seront seules à fournir l'image, on aura affaire à un fond noir.

Enfin, dans toutes les positions intermédiaires, on aura une certaine transmission de l'une et de l'autre des deux composantes selon un rap-

port quelconque. Comme les transmissions de l'une et de l'autre fractions varient en sens opposé quand l'analyseur tourne, il sera toujours possible de trouver une position telle que M et D soient, après traversée de la lame, dans un rapport quelconque.

II. — LAME DE PHASE DE LOCQUIN.

Basée sur le même principe, cette lame est plus simple que la précédente.

La réalisation est analogue à la lame de Zernike, où le collodion serait remplacé par la cellophane. Cette substance est en effet biréfringente. On utilise ainsi une lame de cellophane demi-onde, c'est-à-dire donnant un rayon ordinaire et un rayon extraordinaire déphasés de π .

Le fonctionnement est le suivant : la lumière incidente étant polarisée, la fraction diffractée le sera également et selon la même direction. Par contre, si la couronne de cellophane constituant la zone conjuguée a son axe optique à 45° de cette direction, la lumière transmise, après traversée de la lame sera, outre son déphasage, orientée à 90° de la précédente.

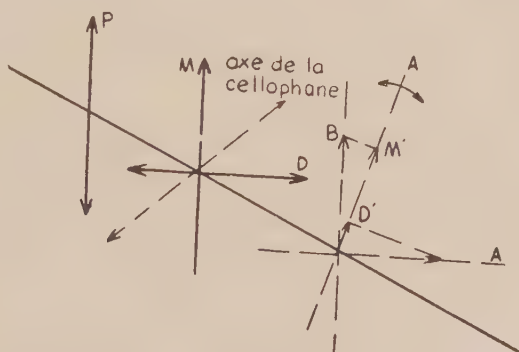


Fig. 15. — lame de phase de Locquin.

Les deux constituantes ne pourront interférer qu'après traversée d'un nouveau système polarisant (analyseur) qui, selon qu'il sera dans la direction A ou B « éteindra » soit M soit D. Les phénomènes seront donc les mêmes sensiblement qu'avec la lame de phase de Taylor.

III. — SYSTÈME DÉPHASEUR DE FRANÇON ET NORMARSKI [118, 119, 120], [107 A — 41].

Très différent des réalisations précédentes, le déphasage est ici réalisé par réflexion. Il s'agit d'une surface de verre AB plane sur laquelle a été déposée par évaporation dans le vide une couche métallique réfléchissante, interrompue en une zone rectiligne ab servant de zone conju-

guée. On utilise donc un diaphragme de forme linéaire. L'image de la source vient se former sur cette fente I. Si l'incidence de la lame est réglée de telle façon que l'angle i soit de 57° , la lumière transmise sera

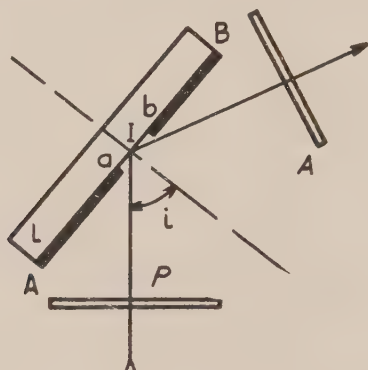


Fig. 16

bien déphasée du fait de l'interruption de la couche métallique, mais elle sera de plus polarisée (incidence brewsterienne pour le verre), alors que la fraction diffractée, réfléchie sur le métal ne le sera pas. L'emploi d'un analyseur sur l'oculaire permettra de rendre variable le coefficient T du système, tout en ne laissant persister que les composantes parallèles des deux ondes.

Le fonctionnement peut être représenté par le schéma ci-contre :

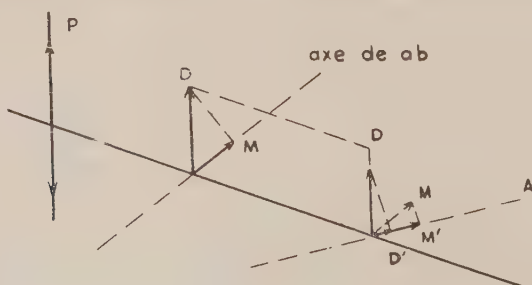


Fig. 17

P représente l'intensité et la direction de polarisation de la lumière incidente, I l'amplitude et la direction de vibration de l'onde M après réflexion sur la zone conjuguée. Son amplitude est donnée par la relation :

$$\vec{I} = \vec{M} \cos \widehat{P I}$$

ou $\widehat{P I}$ est l'angle des directions de polarisation de P et de I . A ce niveau, la fraction diffractée D ne subit aucune modification puisque la surface de réflexion est métallique.

En A et B sont représentées les directions de polarisation et les amplitudes après traversée de l'analyseur. Elles correspondent à la projection des vecteurs en I sur la direction de l'axe de polarisation de l'analyseur A :

$$\vec{D}' = \vec{D} \cos \widehat{A P} \quad \vec{M}' = \vec{M} \cos \widehat{P I} \cos \widehat{I A}$$

Si l'on croise les directions I et A , seule la composante D persiste, de même, si l'on croise I et P et à ce moment, c'est A qui contrôle l'amplitude de D' .

Si A et P sont parallèles, l'amplitude de D' est égale à celle de D et M' est uniquement fonction de la position de I , c'est-à-dire qu'il pourra prendre toutes les valeurs comprises entre 0 et 1, sans que D se trouve modifié. Ceci est bien équivalent à un coefficient de transmission variable.

Il faut souligner qu'ici, le diaphragme et la zone conjuguée sont en forme de fente. Le système présentera donc une direction privilégiée et l'image obtenue pourra présenter les inconvénients relatifs à ce mode de réalisation vis-à-vis des préparations orientées. Heureusement, de telles préparations sont assez rares, surtout en biologie, et l'avantage d'un paramètre T variable compense largement le léger inconvénient d'une direction privilégiée dans la résolution des détails.

IV. — COMPENSATEUR DE LYOT.

Du au regretté astronome B. Lyot, utilisateur du contraste de phase dès 1934 dans le but de contrôler la perfection des surfaces optiques de lentilles astronomiques (coronographe), ce dispositif permet un contrôle du déphasage au niveau de la lame.

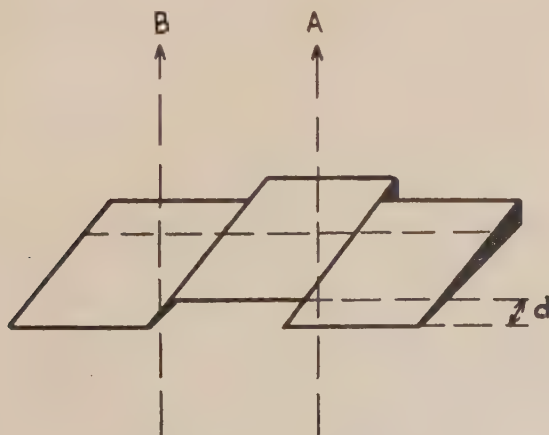


Fig. 18. — Compensateur de Lyot.

Il se compose d'une lame prismatique de quelques minutes d'angle au sommet, et dont la partie centrale découpée peut se déplacer longitudinalement par rapport au reste du système. Le déplacement de cette zone conjuguée mobile fait varier la différence de trajet optique entre celle-ci et le reste de la lame. Le schéma est le suivant :

Le trajet optique du rayon lumineux A qui traverse la partie mobile diffère de celui du rayon B d'une valeur qui dépend de la position de cette partie mobile. On peut ainsi modifier la phase relative de A par rapport à B de la valeur voulue par un décalage approprié.

La valeur de T n'est pas modifiée par le réglage, du moins si la lame est entièrement constituée de même matériau, verre transparent par exemple.

Le déphasage résultant du décalage d de la portion centrale de la lame prismatique est donné par la formule :

$$\varphi = \frac{2 \pi d n \cos \alpha}{\lambda}$$

ou

d = décalage

n = indice de réfraction

α = angle au sommet

V. — DISPOSITIF D'OSTERBERG [130-131].

La variation des paramètres est obtenue par le jeu de systèmes polarisants et biréfringents.

La lumière de la source est polarisée par un polariseur P . En L_1 se trouve une lame biréfringente quart d'onde (quartz, cellophane) et en L_2 une lame constituée de 2 polaroïds croisés et occupant, l'un la zone conjuguée, l'autre le reste de la lame. Les axes de la lame biréfringente sont à 45° de chacun des axes de la lame L_2 . On a ainsi affaire à un polariseur circulaire double.

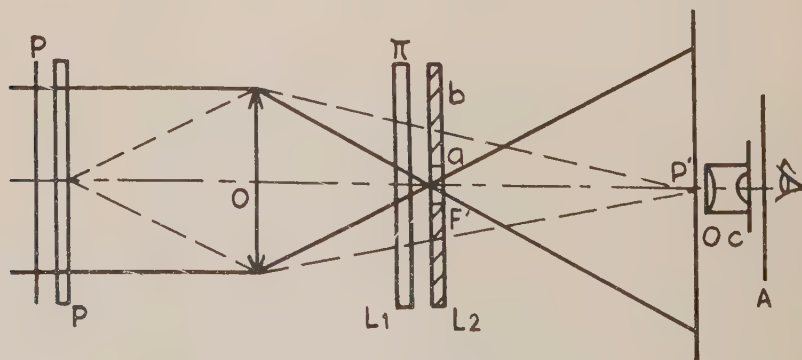


Fig. 19. — Dispositif d'Osterberg.

La présence de P modifie les relations de phase entre les ondes transmises et diffractées, d'une façon variant avec l'angle entre son axe de polarisation et les axes de la lame de phase complexe π : selon que la direction de polarisation de P sera parallèle ou perpendiculaire à l'axe principal de la lame biréfringente la lumière diffractée sera en avance de phase ou en retard de 90° sur la lumière transmise, les positions intermédiaires donnant une différence de phase également comprise entre $+ 90^\circ$ et $- 90^\circ$, le schéma ci-contre représentant les directions respectives de polarisation des éléments du système complexe.

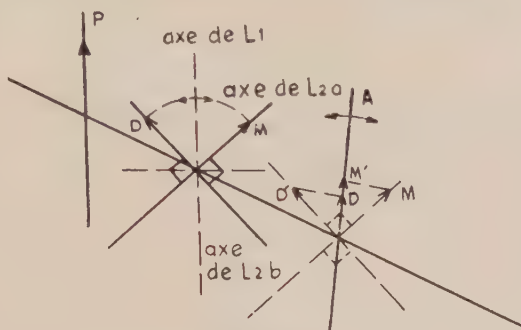


Fig. 20

On obtient donc, par rotation du polariseur P des relations de phase réglables à volonté et absolument quelconques, mais qui ne peuvent interférer puisque polarisées perpendiculairement. Là encore, un analyseur situé au niveau de l'oculaire permettra, en ne conservant que les composantes parallèles à son plan de polarisation, de faire apparaître l'image par interférence, et ce, avec des relations d'intensité qui varieront selon la direction de ce dernier plan de polarisation. On aura donc à la fois un déphasage variable et un coefficient de transmission variable, et ce, de manière indépendante, permettant ainsi de trouver à volonté les caractéristiques optima quelle que soit la préparation à examiner.

VI. — DISPOSITIF DE KASTLER ET MONTARNAL [54]

C'est comme le précédent une application des propriétés associées de la polarisation et de la biréfringence.

La lame est constituée par une « lame quart d'onde » de quartz, c'est-à-dire donnant après sa traversée un rayon ordinaire et un rayon extraordinaire déphasés de 90° , dont l'axe principal de la zone conjuguée rectiligne est croisé par rapport à celui de la zone complémentaire. Si la lumière incidente est polarisée, elle traversera les deux zones en présentant une différence de marche de 90° , et en même temps, les deux zones produiront une rotation du plan de polarisation en sens inverse de 45° . Si le plan de polarisation incident est parallèle à l'axe « rapide » de la zone conjuguée, la lumière transmise sera « en avance »

sur la lumière diffractée. Dans le cas contraire, c'est l'inverse qui se produit. On a donc une inversion du déphasage. Un analyseur complète le système en permettant l'interférence des 2 ondes ainsi obtenues selon le principe exposé précédemment.

Les auteurs ont décrit par la suite un autre dispositif du même ordre, où ils associent une lame demi-onde réalisée de façon analogue et une lame quart d'onde ordinaire, l'ensemble étant plus aisé à réaliser. Le fonctionnement est le même.

b) Dispositifs utilisables avec une optique standard

La nécessité d'utiliser des objectifs spéciaux a amené les opticiens à imaginer des montages où le contraste de phase serait produit en dehors de l'optique proprement dite du microscope et sans intervention de modification des objectifs en particulier.

Les procédés décrits ici ont vu jour à l'Institut d'Optique à Paris.

I. — DEMI-SPHÈRE DE FRANÇON (1949) [107 A].

C'est un véhicule optique complexe dont le but est de produire d'un objet une image à contraste de phase de grandissement égal à l'unité, qui sera par la suite agrandie par le système optique d'un microscope classique.

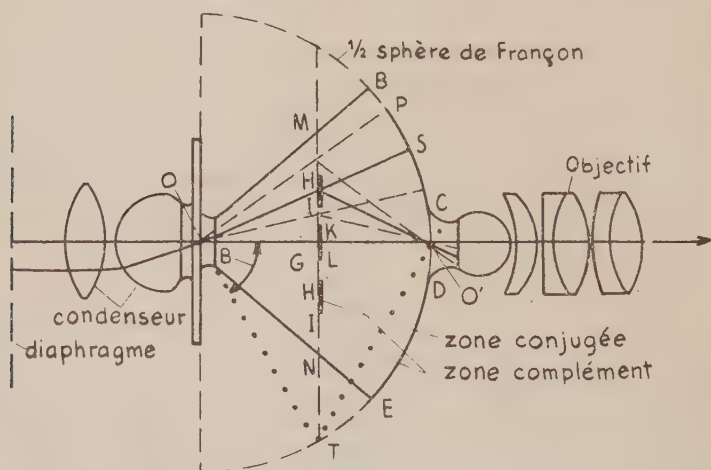


Fig. 21

Selon la figure, BCDE représente la surface d'un segment de sphère centré en O et coupé en deux parties selon un parallèle MGN, la distance OG étant égale à la moitié du rayon de la sphère.

La surface de section MGN est polie, et par évaporation, on constitue sur cette surface une lame de phase par les méthodes générales (évaporation sous vide, gravure et remplissage, collage d'un anneau de collodion ou de cellophane...). La surface centrale KL est rendue opaque et par dessus la lame de phase, on applique un dépôt semi-réfléchissant. L'ensemble est utilisé en immersion homogène, après argenture de la calotte sphérique, sauf en CD.

La fraction transmise de la lumière vient se réfléchir en S sur la calotte argentée après avoir traversé la zone HI, zone conjuguée déphaseuse, puis vient se réfléchir sur la surface semi-réfléchissante MN et enfin, se trouve en O', dans la zone non argentée de la calotte (partie CD).

La fraction diffractée parcourt un trajet équivalent, mais sans traverser la zone HI. Elle se retrouve ainsi en O' avec un déphasage relatif par rapport à la fraction transmise.

Le point O' est le point conjugué de O par rapport au miroir BCDE sphérique et au miroir MN plan. L'image en O' est donc bien de même taille que l'objet en O puisque O est précisément le centre de la sphère, mais le déphasage donne en O' une image en contraste de phase. Cette image étant réelle, il est possible de l'examiner à travers un microscope tout comme l'objet lui-même.

La zone déphaseuse incorporée dans le véhicule peut être douée des mêmes propriétés d'absorption, de biréfringence, de polarisation que dans le cas d'une lame classique. Les mêmes relations entre T, M, D, et les phases respectives des fractions lumineuses sont également valables.

II. — DISPOSITIFS DE FRANÇON ET NORMARSKI [120].

La lame de phase décrite par ces auteurs et étudiée à propos des systèmes à absorption variable peut être utilisée avec une optique classique. Cette disposition a fait l'objet d'une réalisation commerciale française.

Le système optique du microscope sert à projeter l'image de la fente du condenseur sur la zone conjuguée, après quoi l'image proprement dite est formée par un second oculaire d'observation.

Pratiquement, la réalisation ressemble à une rallonge monoculaire inclinée habituelle, se plaçant sur l'oculaire du microscope. Naturellement, un diaphragme approprié vient se placer au foyer du condenseur.

Deux variantes de ce dispositif existent. La première permet la variation de T par l'emploi de systèmes polarisants, entre autres la zone conjuguée où la lumière directe est polarisée par réflexion vitreuse sous l'incidence brewsterienne. La seconde, plus récente, utilise une lame de phase réfléchissante mais le déphasage s'effectue non plus à ce niveau mais au moyen d'un compensateur de Bravais.

Cette brève énumération des systèmes optiques à caractéristiques variables met en évidence l'intérêt des opticiens pour des réalisations d'utilisation aussi générale que possible, en utilisant toutes les ressources de la polarisation et de la biréfringence afin d'aboutir à une solution de portée absolument générale. Quelles que soient les difficultés de réalisation pratique les solutions proposées sont d'une richesse étonnante et extrêmement satisfaisantes pour l'esprit.

Il n'en reste pas moins que, même par l'utilisation des systèmes les plus simples à caractéristiques fixes, la méthode est d'un intérêt capital dans le domaine de la recherche biologique. Il faut toutefois souligner que, beaucoup plus qu'en microscopie classique, l'utilisation rationnelle du contraste de phase demande une compréhension précise des phénomènes présidant à la formation de l'image.

CHAPITRE IV

CONTRASTE DE PHASE COLORE

a) Principe

Les équipements à contraste de phase utilisés donnent uniquement un contraste d'intensité, l'image de la particule observée ne différant du fond que par la luminance. De multiples essais de contraste coloré ont été expérimentés, dont le but était de donner à l'image des différences de teintes uniquement dues aux différences de trajet optique au niveau de la préparation, en dehors de toute coloration substantielle.

Dès 1949, les recherches de Taylor, Brice et Zernike [92-93], de Barer [8], s'appliquèrent à modifier les réalisations ordinaires en systèmes faisant apparaître en plus du contraste d'intensité un contraste coloré par des méthodes uniquement physiques.

Dans les études théoriques qui précèdent, il a été admis implicitement que la longueur d'onde pouvait varier sans que la nature des phénomènes observés soit modifiée. Ceci n'est pas strictement exact et nécessite des modalités pratiques de réalisation bien déterminées pour être pratiquement vérifié. Malgré une lame rendue achromatique par le choix judicieux de l'épaisseur et des indices de réfraction et de dispersion des matériaux utilisés, l'emploi d'une lumière pratiquement monochromatique reste préférable pour les objets difficiles à résoudre du fait de la faiblesse de leur trajet optique.

En s'éloignant résolument de cet achromatisme, on arrive à des résultats complètement différents.

Les indices de réfraction varient avec la longueur d'onde considérée, et par conséquent les trajets optiques varient également ainsi que les déphasages. Si l'on arrive à constituer une lame de phase ou le déphasage relatif des 2 fractions transmises et diffractées par les zones conjuguée et complémentaire varie beaucoup avec la longueur d'onde, l'image sera affectée de contraste coloré.

Soit : n_1 l'indice de la zone conjuguée à λ_1
 n_2 l'indice de la zone conjuguée à λ_2
 n'_1 l'indice de la zone complémentaire à λ_1
 n'_2 l'indice de la zone complémentaire à λ_2

Par un choix approprié des dispersions des matériaux, on peut avoir :

$$E(n_1 - n'_1) = - \frac{\lambda_1}{4}$$

$$E(n_2 - n'_2) = 0$$

Dans ce cas, l'image en contraste de phase n'apparaîtra que pour la longueur d'onde λ_1 , tandis que pour la composante λ_2 , l'image sera celle que fournirait un microscope classique, c'est-à-dire d'un contraste pratiquement nul. La particule observée sera donc vue, si son trajet optique est supérieur à celui du milieu de montage d'une teinte prédominant en couleur λ_2 sur un fond dont la teinte sera la résultante des deux composantes.

Partant de ce principe, il est possible d'imaginer une modalité de réalisation plus complète, fournissant toute une série de déphasages différents le long du spectre. Il est en effet possible d'imaginer une combinaison d'indices de réfraction et de dispersion de telle manière que, d'un bout à l'autre du spectre le déphasage varie intentionnellement entre des valeurs suffisamment éloignées. Le cas le plus intéressant est celui qui inverse le sens du déphasage entre les deux extrémités du spectre.

Supposons par exemple que, pour une λ_1 correspondant à l'extrémité bleue du spectre, on ait :

$$E(n_1 - n'_1) = - 0,25 \lambda_1 \text{ (contraste sombre)}$$

et que pour la portion rouge

$$E(n_2 - n'_2) = + 0,25 \lambda_2 \text{ (contraste clair)}$$

l'image prendra alors un aspect très particulier et les structures apparaîtront colorées si la lumière incidente est blanche. En effet, considérons un objet plus réfringent que le milieu. En lumière bleue, on aura un contraste sombre. En lumière rouge au contraire, on aura un contraste clair. Si la lumière utilisée est blanche, l'objet apparaîtra avec un spectre privé de bleu et enrichi en rouge. La résultante donnera une teinte rougeâtre plus ou moins prononcée selon la valeur du trajet optique et le coefficient de transmission de la zone conjuguée. Un objet moins réfringent que le milieu donnera de même naissance à un phénomène chromatique équivalent, mais où le bleu prédominera aux dépens du rouge. Il sera affecté d'une teinte verte.

Naturellement ce schéma explicatif n'a qu'une valeur qualitative. Comme le contraste avec une lame donnée dépend de la valeur de T et également du déphasage, la plupart des teintes intermédiaires pourront

apparaître selon les objets, et les préparations complexes ou certains détails ont un trajet optique différentiel positif, d'autres un trajet négatif montreront des aspects très variés de coloration. Il faut toutefois préciser que dans la plupart des cas, la saturation des teintes obtenues est assez faible, aussi les teintes les plus apparentes seront celles où le seuil chromatique est le plus bas, correspondant aux zones spectrales : rouge et vert-bleu.

Il est ainsi possible d'obtenir une image colorée optiquement, ce qui peut apparaître comme un intérêt non négligeable avec toutefois cette restriction, à savoir que les teintes obtenues ne sont absolument pas spécifiques. Mais le gros intérêt de ce genre de lame de phase possédant une forte variation de ses caractéristiques de déphasage avec la longueur d'onde est la possibilité d'ajuster le déphasage à la valeur voulue en fonction de l'objet à examiner et d'obtenir ainsi le contrôle partiel du contraste. Supposons qu'au lieu d'employer la lumière blanche pour l'éclairage du système, on éclaire à l'aide d'un monochromateur permettant d'obtenir la longueur d'onde voulue, il sera ainsi possible d'ajuster le déphasage par variation de cette longueur d'onde. En outre, si le déphasage est négatif dans le bleu par exemple, et nul dans la portion moyenne du spectre, il sera positif dans le rouge et l'on passera insensiblement d'un contraste clair à un contraste sombre ou vice-versa en parcourant le spectre lumineux. Il s'agit en conclusion d'un dispositif à déphasage variable particulièrement précieux par sa facilité d'emploi.

b) lame interférentielle de Locquin

Une réalisation, très différente quant à son principe, a été étudiée sur un plan beaucoup plus pratique et réalisée commercialement par Wild sous le nom de Varicolor. Elle repose directement sur les propriétés des filtres interférentiels, et utilise une lame de phase interférentielle de Locquin.

On connaît les propriétés de transmission des filtres interférentiels constitués par la superposition de couches semi-réfléchissantes et transparentes alternées. Il existe un maximum de transmission dans le spectre dépendant des trajets optiques des couches transparentes, les portions spectrales non transmises étant réfléchies, partiellement du moins, le filtre n'étant totalement réfléchissant pour aucune portion spectrale.

La courbe de transmission théorique d'un tel filtre est représentée ici. Une lame de phase ainsi constituée est susceptible d'être utilisée en vue de faire varier le coefficient T , par réglage de la longueur d'onde de la lumière incidente.

Mais un filtre interférentiel possède en outre une propriété d'un intérêt considérable, celle de déphaser d'une valeur très variable les com-

posantes lumineuses de longueur d'onde différentes surtout aux alentours du maximum de transmission.

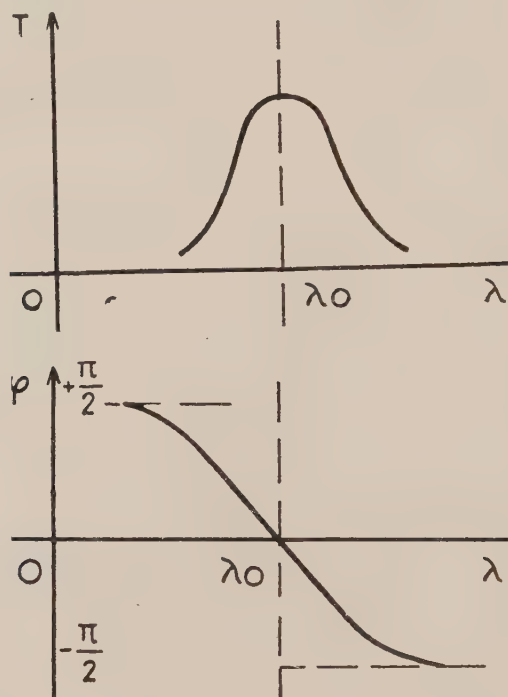


Fig. 22. — Déphasage dans la lame de Locquin en fonction de la longueur d'onde.

Le phénomène a été étudié par Dufour [137 A 137 C] et Locquin [137 B]. Nous ne donnerons pas ici l'étude théorique du phénomène, nous nous contenterons de fournir les courbes représentatives de l'absorption et du déphasage obtenus par une telle lame de phase.

Si l'on éclaire une telle lame interférentielle avec une lumière de longueur d'onde régulièrement croissante, on voit que la transmission passe par un maximum plus ou moins aigu selon la modalité de réalisation de la lame (nombre de couches successives, coefficient de réflexion de chaque couche), mais simultanément, le déphasage entre la lumière incidente et la lumière émergente diminue considérablement, de façon non linéaire, surtout au voisinage du maximum de transmission. La lame possède un trajet optique apparent qui varie rapidement aux alentours du maximum de transmission.

L'emploi de cette lame interférentielle comme lame de phase permettra ainsi de faire varier simultanément le déphasage et le coefficient de transmission en variant la longueur d'onde de la lumière utilisée.

Dans le bleu, l'image d'un objet de trajet optique supérieur à celui du milieu apparaîtra en contraste clair par exemple, tandis que si l'éclairage est réalisé en lumière rouge, le contraste sera sombre. Pour les valeurs intermédiaires de cette longueur d'onde, on obtiendra un déphasage et une transmission qui s'ajusteront à volonté aux caractères optiques de l'objet.

Si l'éclairage est dichromatique [137 D], constitué à la fois de lumière rouge et de lumière bleu, l'image sera en contraste clair pour la portion bleu-vert du spectre et en contraste sombre pour l'autre extrémité. Il en résultera donc une image de teinte bleu-verdâtre sur un fond constitué du mélange des deux teintes. Si l'objet examiné possède un trajet optique inférieur au milieu environnant, il apparaîtra en rouge. Un élément complexe pourra donc apparaître avec des teintes variées qui ne dépendront que de ses propriétés optiques.

CHAPITRE V

CLASSIFICATION DES LAMES DE PHASE

La diversité possible des réalisations de la lame de phase, du fait de la possibilité de construire des dispositifs de valeur quelconque pour l'absorption et le déphasage nécessite une classification précise et détaillée tenant compte des valeurs de ces paramètres.

A notre connaissance, il existe trois classifications différentes, dues respectivement à Bennett [11, 14], à Oettlé [138] et enfin à Locquin [139 A]. Nous allons les étudier successivement.

La classification de Bennett est certainement la première en date (1946). Elle n'est guère utilisée qu'aux Etats-Unis, et le code utilisé est le suivant.

Un premier nombre indique la valeur du coefficient T, suivi d'une lettre A ou B. La lettre A s'applique aux lames de phase du type usuel affaiblissant la lumière transmise, c'est-à-dire où la zone conjuguée est absorbante. La lettre B signifie au contraire que l'affaiblissement porte sur la fraction diffractée, le pouvoir absorbant étant situé au niveau de la zone complémentaire. Suit la notation de la valeur du déphasage. Est considéré comme négatif (—) le déphasage correspondant à un trajet optique supérieur au niveau de la zone conjuguée, ce qui revient à produire un retard de phase dans la lumière transmise, ou ce qui est parfaitement équivalent, une avance de la lumière diffractée. Dans le cas contraire, le déphasage est considéré comme positif. Ce déphasage est mesuré en valeurs de λ pour la longueur d'onde standard de la raie verte du spectre étalon de Hg, 546,1 m μ .

Cette classification est de l'aveu même de son auteur [14] manifestement incomplète. Elle passe en effet complètement sous silence les caractères dimensionnels de la zone conjuguée dont les valeurs, si elles ne sont pas critiques quant aux résultats obtenus mériteraient d'être connues, permettant éventuellement ainsi d'expérimenter des séries d'objectifs non homogènes, mais fonctionnant néanmoins avec des diaphragmes de même taille, ne nécessitant donc pas obligatoirement l'acquisition du condenseur spécial. Quels que soient les avantages et les inconvénients de cette classification, elle aboutit à des formules de ce type :

Apochromat. 100 X : 1,20/0,15 A/ — 0,25 λ

correspondant à un objectif apochromatique de grossissement propre 100, d'ouverture numérique 1,20 possédant une lame de phase quart d'onde (— 0,25 λ) dont la zone conjuguée retarde la lumière de cette valeur, et avec un coefficient de transmission à ce niveau de 0,15.

La classification de Cettlé [138] diffère de celle de Bennett d'une part quant à l'expression du déphasage qui est exprimé en degrés (la convention portant sur le sens positif ou négatif est identique à celle de Bennett), et surtout pour le paramètre T. L'absorption est ici toujours comptée en pourcentage, et exprimée en valeur de l'onde après traversée par rapport à l'onde incidente. Dans cette nomenclature, l'objectif cité plus haut devient :

Apochromat. 100 X : 1,20/15 pc A — 90°

La lettre A ou B ayant la même signification que précédemment. La grosse différence apparaît surtout pour les lames du type B de Bennett. Au lieu de chiffrer toujours la transmission de la zone complémentaire par rapport à la zone conjuguée, ce qui donne automatiquement dans la première classification des nombres toujours supérieurs à 1 pour les lames de type B, ici, la convention numérique adoptée reste la même, et ainsi, les notations équivalentes seront par exemple :

Achromat. 60 X : 0,45/2,5 B — 0,25 (Bennett)

Achromat. 60 X : 0,45 /40 pc B — 90° (Cettlé)

La lettre B signifie donc que la zone complémentaire à un coefficient de 40 %, sans convention supplémentaire.

La classification de Locquin [126] admet une notation différente. L'auteur pose en préliminaires une distinction en quatre points des différentes lames, que nous reproduisons ici :

— La lame de phase « pure » n'agit que sur les relations de phase des faisceaux transmis et diffracté.

— La lame d'amplitude « pure » n'agit que sur les rapports d'amplitude.

— La lame de phase et d'amplitude (lame de phase de la plupart des auteurs), combinaison des deux précédentes, produisant une absorption de la lumière transmise.

— La lame de phase inversée, analogue à la précédente, mais faisant poster l'absorption sur la lumière diffractée.

Il est à remarquer que les deux derniers types correspondent respectivement aux types A et B de Bennett. Le premier type correspond à la réalisation primitive de Zernike. Enfin, le second type a fait l'objet d'une réalisation industrielle [Anoptrol Reichert - 139 E] dont nous reparlerons à propos des réalisations pratiques.

La classification repose naturellement sur les valeurs du déphasage et de la transmission. Le premier type de lame sera noté :

Ph — $\pi/2$

correspondant aux notations :

$$\begin{aligned} \text{I B} &= 0,25 \lambda \text{ (Bennett)} \\ 100 \text{ pc A} &= 90^\circ \text{ (Céttlé)} \end{aligned}$$

Les lames d'utilisation les plus courantes seront notées :

$$\text{Ph} + \pi/2 : 20$$

correspondant aux notations :

$$\begin{aligned} 0,2 \text{ A} + 0,25 \lambda &\text{ (Bennett)} \\ 20 \text{ pc A} + 90^\circ &\text{ (Céttlé)} \end{aligned}$$

pour le type A (troisième type de Locquin), et

$$- \text{Ph} - \pi/2 : 20$$

correspondant aux notations :

$$\begin{aligned} 5 \text{ B} &= 0,25 \lambda \text{ (Bennett)} \\ 20 \text{ pc B} &= 90^\circ \text{ (Céttlé)} \end{aligned}$$

Cette dernière nomenclature permet une notation des lames à caractères variables : on aura par exemple :

$$\text{Ph} - \pi/2. \text{ V}$$

absorption variable et Ph. V., absorption et déphasage variables.

Dans les chapitres relatifs aux appareils et à leur application, nous adopterons cette dernière nomenclature, tout en citant le cas échéant les autres notations courantes fournies par des références bibliographiques importantes. Il nous semble en effet logique d'utiliser cette notation pour les raisons suivantes :

1° Elle s'adapte sans convention spéciale à toutes les lames de phase connues, même de caractéristiques variables.

2° Elle exprime le déphasage de façon conforme aux formules utilisées dans les calculs, tant théoriques que pratiques.

3° La valeur du coefficient de transmission s'exprime toujours par un nombre inférieur à 1 (ou à 100 %, ce qui revient au même et semble plus immédiat à l'esprit), conformément à la théorie.

Il n'y aura donc pas besoin de convention supplémentaire, et n'importe quelle lame de phase pourra être désignée sans difficulté.

Quant aux termes « Contraste positif » et « Contraste négatif » nous les éliminons résolument de notre vocabulaire. Ainsi que nous l'avons indiqué, une telle terminologie nécessite des conventions supplémentaires à notre avis inutiles, de toute façon indépendantes de celles adoptées pour les lames de phase et réalisant une complication superflue. Les termes de « Contraste clair » et « Contraste sombre » seront utilisés à leur place, sans ambiguïté ni précaution rhétorique superflue. La désignation des résultats n'en souffrira pas, les ouvrages Anglo-Saxons n'utilisent d'ailleurs pas d'autre terme (Bright Contrast or Dark Contrast).

TROISIEME PARTIE

**LE MICROSCOPE A CONTRASTE DE PHASE
ET SON EMPLOI**

CHAPITRE PREMIER

LE MICROSCOPE

Ces quelques mots sont consacrés à l'étude pratique du réglage de l'appareil. Il n'y aura donc pas lieu de s'étendre longuement sur ce sujet, du fait de sa parenté avec l'utilisation rationnelle d'un microscope classique.

I. — L'ÉCLAIRAGE.

L'obtention d'une image microscopique correcte quelconque est subordonnée à l'emploi d'une source lumineuse adéquate. En microscopie classique, l'emploi des lampes incandescentes à bas voltage et haute intensité résoud le problème sans difficulté pratique, à condition que le réglage optique soit fait de façon satisfaisante, fait malheureusement souvent négligé par les utilisateurs, au détriment de la qualité des images obtenues.

Les considérations qui vont suivre sont valables de façon équivalente, tant en microscopie classique qu'en contraste de phase.

Hormis les cas où le système d'éclairage est incorporé au statif du microscope, auquel cas le réglage est imposé par construction, la source lumineuse correcte est la lampe spéciale comportant l'ampoule à incandescence, un système optique de mise au point et un diaphragme-iris avec porte-filtre.

L'ampoule à incandescence sera du type bas voltage, de 30 watts au moins, alimentée par transformateur (ou avec résistance chutrice en cas de secteur électrique continu). Cette ampoule doit être centrée convenablement, quel que soit le système employé (éclairage incorporé au statif ou non). Dans la plupart des cas, le système d'éclairage comporte un miroir sphérique derrière l'ampoule. Il est alors nécessaire d'ajuster la position du filament de façon à intercaler les spires de ce filament et leur image fournie par le miroir. Il en résulte un champ éclairé de façon beaucoup plus uniforme. Ceci s'obtient soit en regardant directement le filament après avoir enlevé la lentille collectrice, soit en utilisant cette dernière pour projeter l'image du filament sur une surface quelconque.

Le réglage du système par rapport au reste de l'appareillage consiste essentiellement à obtenir l'éclairage de Köhler. Nous avons vu que cela consiste à éclairer la préparation en lumière parallèle, en formant l'image de la source dans le plan focal du condenseur du microscope. Ce plan focal coïncide par construction avec le diaphragme du condenseur, ainsi que nous l'avons déjà signalé. On réglera donc l'éclairage en formant sur le diaphragme l'image du filament de la lampe par l'intermédiaire



Fig. 23

de la lentille collectrice du système d'éclairage. Dans le cas où un miroir est interposé sur le trajet lumineux, seul le miroir-plan doit être utilisé. Le dernier réglage consistera alors à régler la hauteur du condenseur de façon à voir dans le plan de l'objet le diaphragme de la lampe, qui servira ainsi de diaphragme de champ. Le réglage « géométrique » est alors terminé. On procédera alors aux réglages secondaires, afin d'utiliser au maximum le pouvoir résolvant des objectifs. En microscopie classique, il est bon d'ajuster l'ouverture numérique du condenseur à celle de l'objectif utilisé. Mais en contraste de phase ceci est réalisé par construction. Vu la forme spéciale et les dimensions bien déterminées du diaphragme, il n'est pas possible d'apporter de modification à cet endroit. Pour la même raison on ne pourra modifier l'intensité du flux lumineux, ce qui, de toute façon, n'est qu'une réduction de l'ouverture numérique du système avec tous les inconvénients qui en résultent : diminution du pouvoir résolvant, augmentation des aberrations...

Si la lumière est réellement trop intense, la seule solution est l'interposition de filtres neutres, ou à la rigueur d'un verre finement dépoli lorsque les objets examinés ne sont pas trop difficiles à résoudre. On peut, avec les lampes à incandescence réduire l'intensité du courant traversant le filament par montage d'une résistance en série avec ce dernier. On compensera alors avec un filtre bleuté le rougissement de la lumière résultant de la baisse de température provoquée.

Enfin, il est possible de réaliser soi-même une série de filtres neutres d'intensité graduelle en photographiant une surface bien uniformément éclairée avec un appareil à petit format et sous des temps de poses régulièrement croissants. Après développement, on obtient ainsi une série de pellicules de plus en plus denses optiquement, très finement dépolies du fait du grain de l'émulsion et neutres du point de vue chromatique. Ces filtres peuvent être utilisés tels quels, ou bien montés entre deux lames de verre bien planes (verres à doubler), par exemple collées au Baume de Canada.

A titre indicatif, les verres neutres utilisables ont les références suivantes :

Bausch et Lomb Optical Co Types Crookes 1, 2 et 3.

Bausch et Lomb Optical Co Types Smoke A, B et C

Les absorptions spectrales étant légèrement différentes dans les deux séries, et les coefficients de transmission diminuant de 1 à 3 et de A à C. Les types Crookes 3 et Smoke B diffèrent peu.

En verres d'Iéna, les types NG1 (très sombre), NG2 (moyen), NG3 (sombre), NG4 (moyen), NG5 (moyen), NG6 (clair), BG19 (très clair) sont utilisables.

A strictement parler, les lames de phase n'ont leurs caractéristiques de déphasage exactes que pour une longueur d'onde bien déterminée, et le contraste est toujours meilleur en lumière monochromatique. La longueur d'onde donnant le déphasage nominal est celle de la raie verte du Hg, soit 546,1 m μ . Si on désire utiliser une telle lumière, la source sera une lampe à vapeur de Hg suivie d'un filtre approprié, par exemple le filtre Wratten 62 ou le Wratten 77, associé par surcroît de précaution à un filtre anti-ultraviolet tel le Wratten 2A ou le verre d'Iéna GG13.

Pratiquement, en observation visuelle, on pourra se contenter pour la lumière verte du Hg d'un filtre interférentiel avec une lampe à filament de tungstène, ou même d'un semblable montage donnant une lumière de 555 m μ (maximum de sensibilité oculaire).

En fait, pour l'observation courante, l'emploi d'une lumière monochromatique n'est pas une obligation, l'amélioration de l'image étant moins importante que la théorie ne laissait prévoir du fait de l'achromatisme suffisant de la plupart des lames de phase.

Sauf pour les objets très difficiles à résoudre et dans le cas de la microphotographique, l'observation en lumière blanche est parfaitement suffisante, surtout avec les faibles grossissements.

Il est toutefois préférable d'associer à la source lumineuse un filtre du type lumière du jour, la teinte jaunâtre de la lumière des lampes à incandescence étant désagréable.

Une précaution assez utile consiste à soustraire les préparations vitales à l'échauffement provoqué par l'infrarouge de la source, qui, si elle est assez intense, peut provoquer un échauffement notable de l'objet examiné. Dans ce cas, un filtre en verre d'Iena BG17 (transparent) ou BG19 (neutre clair) produiront un effet satisfaisant.

Tout ceci ne vaut intégralement que pour les préparations incolores. Les préparations colorées naturellement ou artificiellement peuvent avoir des exigences spéciales, surtout si l'on désire augmenter le contraste de certaines couleurs par l'emploi de filtres. En observation courante, on sait que les contrastes sont augmentés par l'emploi d'un filtre de couleur complémentaire à celle de l'objet observé, alors qu'un filtre de même couleur, en atténuant les contrastes, augmente légèrement le « fouillé » de l'image surtout en photographie. Cette notion reste valable en contraste de phase sombre ou elle est naturellement encore plus visible, du fait du contraste fourni en propre par le déphasage. Mais dans le cas du contraste clair, l'effet est exactement inverse. Il est bon de le souligner dès maintenant. Il en sera de nouveau question à propos des techniques photographiques.

II. — LE CENTRAGE.

La superposition correcte de l'image du diaphragme du condenseur et de la zone conjuguée est une condition nécessaire à la formation de l'image. Lorsque l'éclairage est correctement réglé, cette image est correcte en profondeur (elle se forme bien dans le plan de la zone conjuguée), mais elle peut être axialement décalée et excentrée. Un réglage est donc indispensable. Ceci est possible grâce au montage « sur trois points » soit du diaphragme ou du condenseur en entier, soit de l'objectif. La première éventualité est la plus fréquente. Les différents diaphragmes correspondants à chacun des objectifs peuvent comporter un dispositif de centrage commun, auquel cas, le centrage doit être rectifié à chaque changement de grossissement, mais il peut y avoir également un dispositif individuel à chaque diaphragme et alors, le centrage de chacun d'eux se fait une fois pour toutes.

La réalisation de Leitz comporte la possibilité d'équiper le microscope, soit avec un revolver où les objectifs, montés en usine, sont livrés centrés, soit un modèle où chaque objectif est centrable individuellement sur trois points. Ceci est nécessité par la nature spéciale du conden-

seur, dérivé du condenseur à fond noir, ou le même appareillage est utilisable avec tous les objectifs (Condenseur de Heine). Quelle que soit la modalité de réalisation mécanique, la superposition exacte de l'image du diaphragme et de la zone conjuguée se contrôle visuellement à l'aide d'une petite lunette qui se substitue à un oculaire et permet d'observer le plan de la lame de phase, et rend ainsi possible de vérifier les positions relatives de la lame et de l'anneau lumineux correspondant à l'image du diaphragme. On superpose alors aussi exactement que possible cet anneau et la zone conjuguée qui apparaît comme un anneau de même taille d'aspect grisâtre du fait de son coefficient d'absorption.

Pour effectuer correctement cette opération, il faut éviter une lumière trop violente, et il est souvent commode d'interposer sous l'objectif un papier translucide (papier calque de dessinateur par exemple). La lame de phase est ainsi rendue plus visible par la lumière diffusée.

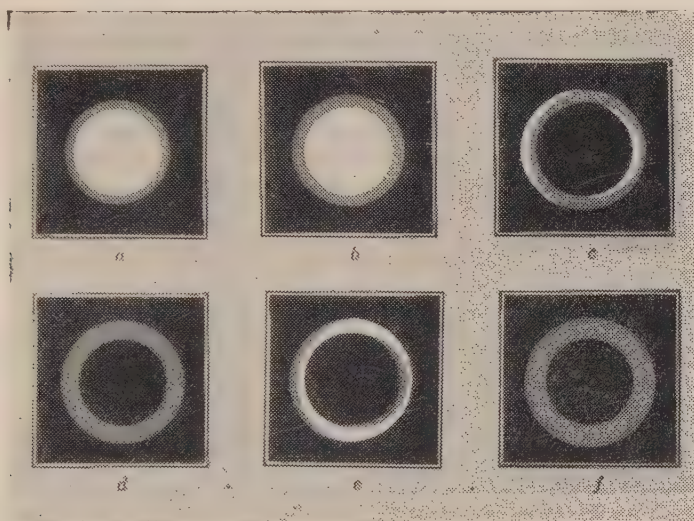


Fig. 24. — Centrage du diaphragme : *a* et *b* : fond clair, *c*, *d*, *e*, *f* : contraste de phase.

Dans certains microscopes, la lunette est remplacée par un disque porte-lentille intercalé entre l'objectif et l'oculaire, dont la rotation vient interposer une lentille sur le trajet des rayons lumineux et transformer l'oculaire lui-même en lunette de visée. Le résultat est le même (dispositif Optovar de Zeiss-Oberkochen).

III. — LES OBJECTIFS.

Peu de détails particuliers sont à noter à propos des objectifs proprement dits, la seule particularité étant la lame de phase qui fera l'objet du paragraphe suivant.

Les différentes séries d'optiques présentées par les constructeurs, tant français qu'étrangers ne diffèrent qu'assez peu des fabrications classiques. Les grossissements partiels sont étagés entre 10 X et 100 X, ce dernier à immersion homogène. Les constructeurs français limitent en général leur fabrication aux modèles achromatiques traditionnels. Les marques allemandes orientent plutôt leur production vers les apochromats et semi-apochromats (objectifs à fluorine), tandis que les Anglo-Saxons restent dans l'ensemble fidèles aux achromats usuels.

IV. — NOMENCLATURE DES LAMES DE PHASES COURANTES

En compulsant les catalogues des constructeurs, un fait apparaît évident : l'uniformité assez générale des fabrications, bien que certaines tentatives du reste couronnées de succès, aient vu le jour ces temps derniers et commencent à entrer dans le domaine de la pratique. Il ne faut pas s'en étonner outre mesure. Le contraste de phase n'existe pratiquement que depuis 10 ans à peu près (l'expérimentation préalable à la construction en série ne rentrant pas en ligne de compte).

D'une façon générale les constructeurs présentent des objectifs à lame quart d'onde exclusivement, à zone conjuguée absorbante (type Ph de Locquin, A de Bennett). Le sens du déphasage est presque toujours

un retard de la fraction transmise ($-\frac{\pi}{2}$). Tous les constructeurs présentent une série d'objectifs de ce type qui, comme il a déjà été signalé, fournissent un contraste sombre avec des préparations dont l'objet est légèrement plus réfringent que le milieu de montage.

Les lames à déphasage opposé sont plus rares. En France, les Etablissements B.B.T. ont une série complète en catalogue, comprenant d'ailleurs, comme pour les lames $-\frac{\pi}{2}$, trois valeurs différentes du coefficient T.

A l'étranger, une série complète de 4 achromats de ce type est présentée par American Optical Co., Galileo construit un achromat 100 X à immersion homogène (O.N. 1,30) et Koristka présente une série $+\frac{\pi}{2}$ en cours de développement à l'heure actuelle.

Les lames des autres types sont infiniment plus rares, toutes construites par des opticiens américains. Citons les lames B, équipant certains objectifs réalisés par Spencer, de type — Ph, et dont la nomenclature du constructeur est :

- 1 B — $0,25 \lambda$ (non absorbante)
2,5 B — $0,25 \lambda$
4 B — $0,25 \lambda$

les deux derniers faisant porter l'absorption sur la fraction diffractée (zone absorbante complémentaire).

Tout ceci a trait aux objectifs à lame produisant un déphasage standard de $0,25 \lambda$ (positif ou négatif). Spencer produit par ailleurs une série dite Bright-Low, dans lequel le déphasage est de $0,05 \lambda$, donc 5 fois plus faible que dans les lames standard. Ce type de lame est particulièrement intéressant avec les préparations colorées. Il semble du reste que dans ce cas, l'importance du déphasage dans la formation de l'image passe nettement au second plan devant l'absorption de la lumière transmise. C'est la tendance à l'égalisation de la quantité d'énergie contenue dans les deux fractions qui produit l'augmentation du contraste.

Cette opinion est à peu près prouvée par la réalisation de Reichert (Anoptral) où la lame de phase est remplacée par un système de même disposition géométrique, avec sa zone conjuguée et sa zone complémentaire, mais où seul persiste le paramètre T, le déphasage relatif étant nul. Il en résulte un contraste clair de l'image examinée, du fait de l'absorption assez forte au niveau de la zone conjuguée de la lumière transmise, la portion diffractée étant intégralement respectée.

L'image résultante est « enrichie » en lumière diffractée et l'on comprend intuitivement que la visibilité s'en trouve augmentée.

Un avantage de ce type de lame résulte de l'absence presque totale des cernes de diffraction au pourtour des particules de trajet optique relativement élevé. On sait en effet que ces franges résultent des aberrations résiduelles des objectifs lorsque les valeurs élevées des trajets optiques produisent des rotations de phase trop élevées, perturbant les relations de phase prévues. Avec ce type de lame non déphaseuse, ce phénomène ne se produit pas et il est possible d'observer plus facilement les préparations relativement épaisses. Il s'agit somme toute d'une sorte de « fond sombre » dont le fonctionnement est analogue au fond noir classique, mais où la lumière transmise n'est que partiellement arrêtée.

Une étude très détaillée de cette réalisation permet de se rendre compte par une iconographie abondante des résultats obtenus [139 E].

V. — DISPOSITIFS DÉPHASEURS PARTICULIERS.

En dehors des objectifs à lame de phase classique, il n'existe guère, à l'heure actuelle, de réalisation vraiment originale pour les lames de phase incorporées au système de lentilles de l'objectif, à une excep-

tion près, l'utilisation de lame interférentielle à déphasage variable en fonction de la longueur d'onde (Varicolor Wild). Ce dispositif, que nous allons étudier, est la seule application commercialisée des modèles à caractéristiques variables étudiés dans la seconde partie de l'ouvrage (Ch. 3 : a).

Les autres réalisations sont tout compte fait assez monotones, à quelques rares exceptions près, hormis naturellement les systèmes déphaseurs par réflexion de Françon et Nomarski, construits par Nachet en France (Ch. 3 : b).

Le Varicolor Wild, est une application de la lame interférentielle de Locquin. L'aspect extérieur des objectifs est semblable à celui de la série classique et le condenseur à diaphragme annulaire est identique à celui utilisé pour cette dernière série. Le seul dispositif accessoire réside en un porte-filtre orientable supportant une lame interférentielle choisie. Le mode de fonctionnement réside dans les variations du coefficient de transmission T et du déphasage de la zone conjuguée en fonction de la longueur d'onde de la lumière incidente. On se souvient que la lame de Locquin possède un pouvoir d'absorption sélectif pour certaines régions du spectre, selon le principe des filtres interférentiels. Ici, le maximum de transmission est situé dans la région moyenne du spectre, vers 550 mμ. On obtient une variation continue du déphasage

qui passe de $+\frac{\pi}{2}$ à $-\frac{\pi}{2}$ lorsque l'on passe d'une extrémité à l'autre du spectre. La convergence des deux phénomènes produit ainsi un déphasage variable combiné à une absorption variable, les extrémités

du spectre combinant un déphasage de $\pm \frac{\pi}{2}$ avec un facteur T faible,

correspondant bien aux objets de petite taille ou de trajet optique faible, la portion moyenne fournit un facteur T élevé et un déphasage

$< \left| \frac{\pi}{2} \right|$ satisfaisant pour les autres cas d'observation.

Il est ainsi possible de régler à volonté les paramètres de déphasage et d'absorption, par simple inclinaison du filtre interférentiel situé devant la lampe, et dont la longueur d'onde transmise varie avec l'angle de rotation.

L'utilisation correcte du Varicolor n'est pas possible en lumière blanche. Il existe en effet toute une zone du spectre où la faiblesse du déphasage et de l'absorption de la lumière transmise donne un contraste très faible qui vient ainsi atténuer et noyer l'image des objets de faible trajet optique. Symétriquement, les objets de grande taille ont leur image brouillée par des franges colorées dues aux portions du spectre où les et des « noirs » sans aucun détail dans les demi-teintes. Les structures de

paramètres de la lame de phase ne conviennent pas. L'utilisation d'un filtre interférentiel est donc une nécessité, mais il est une autre éventualité intéressante. Elle consiste à utiliser un filtre dichromatique transmettant les deux extrémités du spectre. Il en résulte alors un contraste coloré très agréable à observer, sinon facile à interpréter...

a) Le contraste optimum

Les considérations théoriques étudiées à la première partie de l'ouvrage au Ch. 2 d et pour les cas généraux au Ch. 3 c ont exposé de façon détaillée les conditions d'obtention du contraste maximum. L'aspect de l'image qui leur correspond n'est pas le seul utilisable, et il est intéressant de spécifier les conditions réelles d'observation les plus satisfaisantes, compte tenu de la complexité des objets observés.

S'il s'agit d'apercevoir un objet très petit, sans structure interne, en un mot si le problème consiste à déterminer la présence ou l'absence de particules très petites sur une préparation, le problème est simple : le contraste maximum est bien la condition de travail la meilleure. Il en est de même, par exemple en bactériologie, si l'on veut déterminer la mobilité d'un germe, ou sa morphologie approximative.

Lorsqu'au contraire, l'objet est complexe, ou que l'on désire mettre en évidence sa structure interne, comme c'est le cas de la plupart des préparations, les conditions expérimentales sont différentes et le contraste maximum ne convient en général pas, les images étant alors difficilement interprétables.

Si nous revenons sur les phénomènes de diffraction au niveau des bords de l'objet, nous savons qu'il existe au niveau des frontières entre les différents trajets optiques des phénomènes importants de diffraction qui, par suite des reliquats inévitables d'aberration des optiques, fournissent une répartition d'énergie et de phase perturbée au niveau des images. Le phénomène, sensible en microscopie classique avec la fermeture du diaphragme iris (réduction de l'o.n.) du fait des aberrations d'intensités, se complique en contraste de phase des aberrations de phase, ici quelle que soit l'o.n. du système, et les deux phénomènes s'ajoutant, produisent l'effet de cerne particulièrement net avec les objets très différents optiquement du milieu environnant et avec les lames de phase à fort contraste. L'image tend à devenir illisible du point de vue envisagé. Les effets de cerne correspondant aux structures internes de la particule se chevauchent et brouillent l'image définitive. Force est alors de diminuer la différence de trajet optique et la valeur de l'absorption de la zone conjuguée, ce qui a pour conséquence d'abaisser le contraste.

Même en dehors de ces considérations, le contraste maximum représente une certaine difficulté d'observation. Il est tout à fait comparable à certaines photographies trop « dures » où il n'existe que des « blancs » et des « noirs » sans aucun détail dans les demi-teintes. Les structures de

taille ou de trajet optique intermédiaires auront une image, dont la teinte, rejetée soit vers les luminances fortes soit vers l'obscurité, sera difficile à distinguer. On a donc tout intérêt à obtenir le maximum de détail dans les demi-teintes, et non le contraste maximum pour une structure prédéterminée.

Dans le cas qui nous intéresse le plus, à savoir une préparation cellulaire, l'observation devra montrer à la fois le noyau et les particules intracytoplasmiques, toutes formations possédant un trajet optique propre soit plus grand, soit plus faible que le voile cytoplasmique proprement dit. L'image satisfaisante correspondra à un contraste moyen pour ledit voile, à l'intérieur duquel les structures apparaîtront avec une riche gamme de détails de contraste progressif par rapport au champ.

Est-il possible de déterminer *a priori* le type de lame et l'indice du milieu à utiliser dans un cas donné ? C'est pratiquement impossible pour plusieurs raisons. En premier lieu, on ne connaît que d'une façon très grossière la structure optique des particules à observer. En second lieu, les valeurs connues ne sont pas obligatoirement stables dans le temps, surtout s'il s'agit de préparations vitales, ou, à l'opposé, de préparations colorées. Il est donc difficile de calculer théoriquement des valeurs exactes et utilisables. Au surplus, les résultats n'auraient de sens que pour des préparations identiques quant à leurs indices, leurs épaisseurs... La seule méthode vraiment utilisable est de déterminer grossièrement l'indice du milieu de montage que l'on corrigera (si possible) dans le sens voulu en fonction des résultats obtenus, à moins, bien entendu, d'avoir un système à caractéristiques variables à sa disposition.

b) Les préparations

La gamme des objets microscopiques justiciables d'une observation en contraste de phase est immense. En limitant le sujet à la biologie, on peut dire que cette technique est un apport considérable, surtout en ce qui concerne l'étude des structures *in vivo*, la richesse des détails mis en évidence est extrême, au point même, dans certains cas de fournir une image trop complexe d'emblée, donc difficile à interpréter, surtout en histologie normale ou pathologique.

Dans le domaine de la recherche, il est hors de doute que la méthode de Zernike a donné, ces dernières années, une impulsion formidable à l'étude des microstructures vitales, et a permis de résoudre ou d'aborder des problèmes jusqu'alors insolubles. Le nombre des publications faisant mention de la méthode en fait foi.

Il est actuellement possible de se procurer très facilement le matériel nécessaire, il est donc intéressant de citer, outre les résultats obtenus, les précautions techniques nécessaires à l'obtention d'images satisfaisantes.

Si la confection de préparations microscopiques usuelles est bien connue et ne demande que du soin, il existe des précautions supplémentaires à respecter en contraste de phase, en partie dues aux paramètres de la lame de phase utilisée. L'étude théorique a en effet montré l'importance de l'indice de réfraction, du trajet optique dans le résultat final, toutes considérations négligeables en microscopie classique. La permanence des résultats est à ce prix, et il est à notre avis indispensable dans tout protocole expérimental de spécifier la nature de la préparation et la technique utilisée de façon précise. Dans ce cas seul, les aspects observés pourront être retrouvés à coup sûr, et un autre expérimentateur pourra utiliser les notions ainsi mises à jour avec le maximum de conformité des résultats.

I. — PRÉPARATIONS INCOLORES.

Ce groupe comprend d'une part la majeure partie des préparations vitales et d'autre part les objets examinés après fixation mais sans coloration.

Milieu de montage.

Les structures de ces objets diffèrent uniquement par leur trajet optique. Deux structures différentes peuvent avoir le même trajet optique dans un milieu déterminé, bien que leurs épaisseurs et leurs indices diffèrent. L'utilisation d'un autre milieu de montage fera réapparaître les différences d'aspect.

D'une façon générale, plus le trajet optique d'un élément sera grand, plus la structure correspondante sera douée d'un contraste élevé. Symétriquement, si l'indice de ladite structure se rapproche de celui du milieu de montage, l'image tendra à disparaître.

Il y a donc lieu de prévoir une gamme de milieux d'indices différents qui permettront d'obtenir les images correctes désirées dans les limites de compatibilité avec la conservation correcte de la préparation. De faibles variations dans l'indice du milieu utilisé sont nettement visibles dès que la différence atteint 0,05, quelquefois même beaucoup moins. Ceci correspond au sursaut d'intérêt des chercheurs pour l'étude systématique de nouveaux milieux fournis par les matériaux synthétiques modernes. De multiples publications en sont la preuve, surtout aux États-Unis où les milieux de montage traditionnels sont de plus en plus abandonnés. L'ouvrage le plus complet à ce sujet est la publication de Crossmon où l'auteur étudie un grand nombre de formules ainsi que leurs propriétés optiques. Lillie et coll. ont publié de leur côté les résultats obtenus par l'utilisation des milieux aux résines synthétiques dans un rapport très intéressant à ce sujet. Malheureusement, les formules proposées contiennent fréquemment un ou plusieurs produits dont l'équivalent n'est

pas disponible en France, et de plus, la nomenclature des substances synthétiques est compliquée par l'emploi fréquent de désignations commerciales dont l'équivalent n'est pas toujours facile à retrouver.

La table des principaux milieux retenus a tenu compte de ces difficultés et les correspondances aussi exactes que possible y sont données, ainsi que quelques références utiles. Les indices de réfraction correspondent à la température de 20° C sauf mention contraire (voir à la fin de l'ouvrage p. 121).

Préparations vitales.

Ces préparations nécessitent des milieux de montage particuliers, dont l'absence de toxicité et la pression osmotique convenable sont des caractères impératifs. Aussi, les gammes d'indices de réfraction seront-elles plus réduites.

Les modifications d'indices pourront être obtenues par addition aux formules habituelles de corps à grosse molécule dont l'action sur la pression osmotique est négligeable. Il est possible d'utiliser ainsi certaines protéines ou en concentrant le milieu en ses protéines constituantes. Il semble toutefois plus pratique d'utiliser des substances polymères telles que la polyvinylpyrrolidone, la carboxyméthylcellulose dont la concentration variera avec l'indice de réfraction à obtenir.

Il n'est pas possible de donner de formule précise de ces mélanges dont la composition varie selon les besoins. Ainsi nous avons eu l'occasion d'utiliser le liquide de Tyrode additionné de Polyvinylpyrrolidone (Subtosan), comme liquide de montage pour la recherche de *Trichomonas Vaginalis* selon :

Sol de Tyrode : 60

Subtosan 25 % : 40

fournissant un indice voisin de 1,36.

Il faut tenir compte dans de telles formules de l'augmentation de viscosité du milieu, ce qui, pour la recherche des organismes lentement mobiles peut être une gêne. Par contre, l'examen d'organismes très mobiles (*Spermatozoïdes*) est facilité par le ralentissement des mouvements.

Préparations fixées.

Il n'existe pas ici d'impératif particulier quant à la composition du milieu. Toutes les formules sont applicables dans la limite où elles assurent une conservation suffisante des objets. Cependant, il est un point important par les artefacts qu'il peut produire : c'est l'action du fixateur.

Depuis longtemps, les histologistes et cytologistes se sont penchés sur la conservation de l'intégrité des structures au cours de la fixation et les mélanges proposés sont innombrables. Dans le cas du contraste de phase,

une fixation correcte est absolument impérative, et les travaux ont été repris à la lumière de cette nouvelle méthode. Les travaux de Policard, Bessis et Bricka [161 F], de Haselmann et coll. [161 B], de Barati et coll. [161 A], sont démonstratifs à cet égard. Les comparaisons des images d'un même objet avant et après fixation ont confirmé et précisé les avantages respectifs des différentes formules proposées.

Buchsbaum [233] compare les aspects obtenus par différents fixateurs. Les mélanges à base d'acide acétique contractent le cytoplasme. Le formol neutre serait meilleur, mais les résultats les plus satisfaisants seraient obtenus avec le mélange Zenker-Formol additionné d'acide osmique. A vrai dire, ce mélange paraît assez surprenant, le formol, fortement réducteur doit réduire l'acide osmique en quelques secondes — voire instantanément — et le prix de l'acide osmique justifie des précautions à cet égard.

Oliver, Barer, Crawford et Barer notent les importantes modifications dues au formol et déconseillent ce fixateur pour les examens des fins détails.

Citons enfin la publication de Policard et coll. où les études sur les artefacts sont poussées de façon précise pour différents fixateurs. Ils confirment de façon nette l'opinion générale sur la supériorité des mélanges osmiés.

II. — PRÉPARATIONS COLORÉES.

L'utilisation du contraste de phase dans l'examen des préparations colorées est peu connu, vu la vogue des préparations vitales ou simplement fixées qui ont l'avantage de simplifier le travail préparatoire au maximum. Il n'en reste pas moins vrai que l'observation de préparations soumises à des techniques de coloration est grandement facilitée dans certains cas par l'adjonction du contraste de phase au contraste sélectif d'amplitude. De nombreux essais faits surtout par les auteurs américains sont probants à cet égard, en particulier là où les teintes obtenues sont légères.

Les modalités d'augmentation du contraste sont différentes selon que l'on utilise un « contraste sombre » ou un « contraste clair ». Tout d'abord, il faut noter que la coloration modifie les indices de réfraction de l'objet dans des proportions variables mais souvent assez notables. Les répartitions d'énergie entre la fraction transmise et la fraction diffractée sont en outre modifiées selon la fraction spectrale envisagée, contenant ou non la teinte transmise par le colorant. Il en résultera donc des paramètres au niveau de la lame de phase différents de ceux envisagés pour un objet équivalent incolore.

« *Contraste sombre* ».

La structure colorée apparaîtra avec sa teinte rabattue par l'affaiblissement de luminance à son niveau : la couleur obtenue sera plus sombre qu'en observation classique. La visibilité sera bien entendu augmentée surtout dans le cas des colorations légères, mais il sera en outre possible d'augmenter encore le contraste par interposition entre le microscope et la lampe d'éclairage d'un filtre de couleur complémentaire à celle du colorant. Ceci sera encore plus intéressant en photographie.

« *Contraste clair* ».

L'objet apparaissant avec sa teinte propre plus brillant que le fond, il en résultera un effet très satisfaisant de visibilité ressemblant un peu à celui obtenu avec les techniques de fluorescence. L'augmentation de contraste sera ici obtenue avec un filtre de même couleur que la teinte du colorant.

Cette méthode semble particulièrement intéressante avec la coloration de Ziehl-Neelsen des bactéries acido-alcool-résistantes.

Colorations utilisables.

Du fait de la coexistence des deux effets de contraste, l'un dû à la coloration, l'autre à la lame de phase, la méthode conjuguée nécessite des précautions spéciales si l'on veut en tirer tout son intérêt.

Tout d'abord, les colorations intenses habituelles ne sont pas favorables en général, surtout avec le contraste sombre. Les éléments apparaissent avec leur teinte de coloration fortement rabattue par l'assombrissement dû au contraste de phase. Il en résulte une lisibilité très diminuée et un empâtement très prononcé des structures. L'effet est très visible sur une simple préparation hématologique colorée par la méthode panoptique usuelle. Les noyaux sont très assombrés et les détails cytoplasmiques ont un contraste tellement renforcé qu'ils deviennent très difficiles à identifier correctement (granulocytes). D'une façon générale, les colorations intenses produisent à peu près toutes le même effet.

Les colorations légères au contraire peuvent être utilisées avec le contraste sombre, et l'association permet ainsi de vérifier l'électivité d'un colorant avec une structure.

Mais nous croyons en tout état de cause qu'une préparation colorée demande un contraste clair même si sa coloration est peu intense. Les particules intéressantes se détachent sur le fond sombre avec leur couleur propre qui prend une tonalité particulièrement lumineuse. Dans certains cas, l'aspect peut être comparé au résultat obtenu avec certains dispositifs à fluorescence.

Le détail des colorations utilisables est illimité, avec toutefois une restriction pour les colorations intenses. Signalons toutefois l'emploi possible dans les cas généraux de la technique de l'ombrage utilisée en hématologie par Bessis et Bricka [300], selon la méthode usuelle en microscopie électronique.

c) Microphotographie

Les mêmes règles et méthodes sont applicables en contraste de phase et en microscopie classique pour l'obtention de clichés photographiques de qualité satisfaisante. L'abondance des illustrations dans les publications prouverait l'utilité d'une telle méthode de documentation s'il en était encore besoin [193].

Des descriptions complètes d'équipements ont été publiées tant en France qu'à l'étranger. Il n'est donc pas utile de donner énormément de précisions à cet égard d'autant que l'ingéniosité des utilisateurs s'emploie à utiliser un matériel déjà existant et assez variable d'un cas à l'autre.

Source de lumière.

Elle doit être assez intense si le temps de pose doit rester dans les limites raisonnables. Le pouvoir absorbant de la lame de phase et surtout le diaphragme du condenseur diminuent considérablement la lumière à la sortie du microscope. De plus, l'emploi fréquent d'un filtre abaisse encore la luminosité totale. Ainsi, certains auteurs utilisent une lampe à arc afin d'obtenir l'intensité lumineuse désirée. Dans ce cas, si l'examen porte sur une préparation vitale, il est indispensable d'adjoindre au système éclairant un filtre arrêtant l'ultra-violet qui détériorerait rapidement la préparation. De même, un filtre anticalorique est indispensable pour éviter l'élévation de température due à la fraction infra-rouge du spectre. Cette dernière précaution est également valable avec les lampes à incandescence de forte puissance.

La solution de flash électronique (lampe à décharge à haute intensité) semble bien être la plus satisfaisante [187]. L'éclair est extrêmement bref (quelques fractions de milliseconde) et très intense. Un modèle de 200 à 250 joules doit permettre tous les travaux avec les émulsions sensibles actuelles.

Le tube à décharge électronique doit être couplé avec une source à incandescence ordinaire pour permettre la mise au point visuelle de la préparation. Afin de conserver les conditions de fonctionnement correct, un montage particulier doit être adapté : il consiste à former par un jeu de lentilles l'image du filament de la lampe à incandescence dans le plan des électrodes du tube à décharge. Un second jeu de lentilles projette à son tour l'image des électrodes dans le plan focal du condenseur du microscope selon la méthode de Köhler. L'ensemble est naturellement assez encombrant, aussi est-il également possible de réaliser la superposition

des deux sources (ou de leurs images) grâce à des miroirs semi-réfléchissants. Il en résulte une perte de lumière dont il faut tenir compte.

Temps de pose et émulsions.

Aucune règle absolue ne peut être fixée quant au temps de pose à adopter. La meilleure modalité opératoire est de mesurer au photomètre photoélectrique la quantité de lumière dans le plan de l'image en unités arbitraires et d'en établir la correspondance en temps d'exposition grâce à des essais successifs pour chaque émulsion utilisée. Cet étalonnage préalable est la seule méthode valable [188].

Lorsque la source lumineuse est un tube à décharge, le temps de pose est imposé par la durée de la décharge. Si les clichés obtenus sont surexposés, il n'est pas possible de réduire la durée de la décharge autrement qu'en modifiant la valeur de la capacité du condensateur du circuit d'alimentation. Dans ce cas, il est préférable d'interposer sur le rayon lumineux incident un jeu de filtres gris neutre. Ces derniers peuvent être réalisés photographiquement en photographiant une surface unie éclairée plus ou moins intensément. Des clichés homogènes de différentes densités seront ainsi constitués à peu de frais et pourront remplacer les filtres neutres dans la plupart des cas.

Les émulsions utilisées seront du type « grain fin ». Il est peu recommandable d'utiliser les très grandes rapidités proposées par les fabricants, leur grain élémentaire étant relativement gros. Par contre, les émulsions panchromatiques de sensibilité moyenne donneront des images satisfaisantes. Leur sensibilité est d'environ 26° Scheiner (par exemple l'émulsion Panatomic X de Kodak). Pour l'emploi en lumière rouge ou orange, les émulsions orthochromatiques sont difficilement utilisables. Par contre, en lumière verte, elles seront préférées aux panchromatiques peu sensibles dans cette portion du spectre.

Microcinématographie.

Il n'existe pas à proprement parler de technique cinématographique particulière au contraste de phase. Les préparations vitales utilisées ne nécessitent aucune précaution particulière quant au mode préparatoire, si ce n'est de tenir compte de l'indice du milieu utilisé. En cours d'opération, il est bien entendu indispensable de maintenir la préparation dans des conditions compatibles avec une survie prolongée des éléments. Le système le plus pratique est à ce sujet l'étuve microscopique de Foot avec thermostat et évaporateur, modifiée plus ou moins selon les besoins et les possibilités. Ce dispositif est plus stable et moins capricieux que les platines chauffantes d'une régularité de fonctionnement souvent assez précaire.

De nombreux films ont été réalisés dès le début des applications biologiques du contraste de phase (Michel, 1941) et ont mis en valeur l'intérêt de cette méthode dans l'enseignement et les rapports scientifiques [189]. Il n'est plus besoin actuellement d'insister sur les possibilités que le microcinéma en contraste de phase offre aux chercheurs.

On consultera avec intérêt les publications de Dragesco [183], Heard [185], Hughes [186], Ballerini et Scandone [182], ou des détails très complets sont consacrés à ces procédés.

CHAPITRE II

MICROSCOPIE EN CONTRASTE DE PHASE APPLIQUEE A LA BIOLOGIE ET LA MEDECINE

a) Considérations générales

La possibilité majeure de rendre visible les objets transparents et incolores incita les premiers utilisateurs, même théoriciens à s'adresser à des préparations biologiques pour préciser les possibilités de la méthode. De plus, la possibilité d'étudier facilement les préparations vitales a permis d'étudier avec précision l'effet de substances diverses toxiques ou autres sur les cellules et microorganismes avec une facilité remarquable.

Les modifications morphologiques dues à l'hypertonie, à l'hypotonie, aux agents enzymatiques ou fixateurs peuvent être étudiées dynamiquement, pendant le temps même de leur action.

Du fait même des avantages de l'emploi de cette méthode en biologie, ce sont les préparations de ce type qui furent étudiées sur un plan théorique dès 1941 par Köhler et Loos (Cellules sanguines, sédiment urinaire, trypanosomes). Loos présenta la même année des images de fibroblastes, de germes tels que les Staphylocoques, *Corynebacterium Diphtheriæ*, ainsi que divers champignons et levures [172].

Toujours la même année, Michel publia des comptes rendus d'examen de chromosomes des glandes salivaires. La spermatogenèse, chez la sauterelle fit l'objet d'un film [265, 189].

Burch et Stock, de leur côté, en 1942, publièrent une grande quantité de documents photographiques concernant des spirochètes et différentes cellules épithéliales [24].

Des études vraiment systématiques furent faites par Richards en 1944, sur la membrane nictitante des batraciens en vue de déterminer les caractéristiques optima de la lame de phase permettant le meilleur contraste [88]. Knoll, de son côté, traita le problème sous l'angle de la bactériologie [340].

Les articles de portée générale de Taylor [179], Martin [71], Barer [7, 203, 165] et Maglozzi [68] seront utilement consultés et le détail des travaux de ces auteurs donnera d'utiles renseignements.

Du point de vue technique, les chapitres précédents ont déterminé sur le plan théorique les conditions à réaliser, qui restent pleinement valables dans toutes les applications. Lors de l'étude détaillée des applications particulières à chaque discipline, il y aura lieu de préciser quelques points.

Le cas des applications médicales n'est qu'un aspect pratique de l'emploi général du contraste de phase en biologie aussi, le point de vue du diagnostic ne sera-t-il pas obligatoirement explicité dans les descriptions de protocoles expérimentaux.

b) Histologie

Les préparations histologiques et cytologiques ont été l'objet de multiples travaux. L'étude de tels objets par le contraste de phase était *a priori*, un terrain d'étude particulièrement étendu et les publications relatives à ces sujets sont innombrables.

Les applications à l'histologie proprement dite méritent une mention spéciale par les constatations que nous avons pu faire, tant à travers les références bibliographiques qu'au cours d'essais personnels.

L'étude correcte d'une coupe en contraste de phase nécessite une précaution élémentaire capitale portant sur l'épaisseur de la tranche de section : celle-ci n'est jamais trop faible. Les images les plus satisfaisantes que nous ayons pu observer correspondaient à des préparations ultra-minces, d'épaisseur 0,1 μ et réalisées au moyen d'un ultra-microtome servant à la confection des préparations pour microscopie électronique après inclusion au polyméthacrylate (plexiglas). Une telle technique sort donc totalement des méthodes utilisées habituellement (paraffine, collodion...) et nécessite un appareillage et des précautions particulières.

Dans certains cas, on peut utiliser les techniques classiques et utiliser des coupes d'épaisseur maximum 5 μ fournies par un bon microtome et un excellent rasoir. Toute épaisseur supérieure donne des images ininterprétables.

Un second inconvénient est l'obligation de faire subir au matériel à étudier des manipulations incompatibles avec l'examen *in vivo* et donc de se borner à l'étude d'éléments déjà obligatoirement modifiés assez profondément. Le procédé le moins traumatisant est la coupe à la congélation, mais il est pratiquement impossible d'avoir des coupes suffisamment minces. Les autres procédés, nécessitant l'inclusion sont très brutaux. Outre la fixation qui a déjà tendance à produire des modifications dans les structures, les multiples bains de déshydratation et l'im-

prégnation dans le véhicule solidifiable risquent de bouleverser la structure et rendre ainsi illusoire les améliorations escomptées. Les techniques traditionnelles deviennent alors aussi fidèles.

Il faut enfin signaler le fait suivant : du fait de l'absence de teintes artificielles certes, mais assez sélectives, que fournissent les colorations, permettant ainsi de différencier par exemple un épithélium de chorion sous-jacent, les faibles grossissements ne montrent en contraste de phase qu'une accumulation effarante de détails, sans sélection visible. Il est très difficile de voir les limites respectives des différentes formations tissulaires présentes sur la coupe. L'étude topographique est ainsi rendue pratiquement impossible. Pour qui connaît l'importance de cette topographie à faible grossissement dans les diagnostics histologiques, l'écueil majeur apparaît nettement.

Le contraste de phase ne saurait donc remplacer la technique traditionnelle dans cette branche de l'examen microscopique. Ce qui ne veut pas dire qu'il est totalement inutilisable, mais avec des précautions particulières il peut, au contraire, préciser certains aspects dans les structures fines, observées à *fort grossissement*, permettant ainsi d'étudier certaines structures difficilement colorables telles que les striations musculaires, et surtout le tissu nerveux pour lequel les réactions tinctoriales sont topographiquement peu fidèles.

Les publications relatives à l'étude des coupes histologiques proprement dites sont assez rares comparativement aux applications cytologiques de la méthode, et dans la plupart des cas, les auteurs insistent surtout sur l'aspect des cellules en tant qu'éléments individuels plus que sur la structure tissulaire proprement dite, ce qui confirme bien les difficultés d'appréciation des aspects tissulaires généraux en contraste de phase. Citons les exemples des publications de Antonio [201], Bensley [204], Bodingbauer [205], Cole [209], en ostéopathologie, et les études sur les tissus nerveux de Bruni [207], Frauchiger [210], Gatenby et Coll. [211], Green [214], Haar et Wertiz [215-216], Hössly [220], et l'on peut admettre que les études proprement histologiques sont, à quelques exceptions près, réduites à ce petit nombre de publications.

La majorité des autres références sont des études cytologiques, avec les particularités propres aux études à très fort grossissement. La seule différence réside dans le fait que les cellules examinées ne sont pas séparées artificiellement des autres constituants tissulaires.

Particularités techniques.

Nous avons insisté sur la nécessité des préparations très fines et d'épaisseur régulière. Il est en effet indispensable que la coupe soit réduite à une seule épaisseur cellulaire faute de quoi, la superposition des éléments donne une image ininterprétable : le trajet optique est rapidement trop important et cause des effets de cerne déjà signalés. De plus,

les images des différentes structures se superposent et il est difficile d'identifier les traits caractéristiques dus à chaque couche d'éléments.

L'indice moyen d'une coupe histologique montée dans un milieu tel que le baume du Canada, l'huile de cèdre... d'une façon générale après éclaircissement par immersion dans un mélange contenant un hydrocarbure benzénique est voisin de 1,53. Ces milieux donnent donc un trajet optique relativement faible et sont utilisables avec les lames de phase à contraste moyen ou fort usuelles. Mais le contraste obtenu est assez variable avec les lames courantes des différents constructeurs. A titre d'exemple, nous avons examiné la même préparation, montée successivement au baume et à l'huile de cèdre, avec des objectifs à contraste de phase de Wild, Zeiss et Leitz, de grossissement équivalent, et à contraste moyen. Les contrastes obtenus furent très variables, et les différents objectifs ne purent donner des images comparables que par modification du milieu de montage. L'huile de cèdre donnait des résultats nettement supérieurs avec l'optique Wild, le baume avec les objectifs Zeiss. Le montage Leitz aurait nécessité un indice de milieu encore plus faible pour donner une image comparable. Ces phénomènes s'expliquent aisément par de légères différences du facteur T de chaque lame déphaseuse.

Ceci s'explique avec facilité. L'épaisseur moyenne des coupes examinées étant approximativement de $5\ \mu$, une faible différence de l'indice du milieu de montage provoquait des variations appréciables du trajet optique au niveau de l'objet examiné, beaucoup plus sensibles qu'avec des particules de taille très inférieure.

Méthodes employées et résultats.

Il importe de citer à propos des méthodes utilisées en histologie, une des conclusions de Oliver, à propos d'études sur le rein : " These Illustrations emphasize the necessity of the use of varying phase contrast in the examination of a tissue if one is to feel confident that he has seen all of the structural detail within the specimen ". Bien qu'un tel état de chose ne soit pas particulier aux préparations histologiques, il prend ici une importance accrue du fait de la difficulté assez générale d'interprétation des aspects observés.

L'étude des structures fibreuses paraît avoir été le terrain d'application le mieux adapté à la méthode d'observation en contraste de phase. Les études de Loos [172] font mention de la mise en évidence des fibres élastiques à l'aide d'une lame $0,1A - 0,25\ \lambda$. La même lame donne de bons résultats dans l'étude de la structure organisée du cartilage, dont les détails sont encore plus visibles après traitement au Bleu de Toluidine dont la métachromasie augmente encore la visibilité différentielle. Dans ce dernier cas, c'est une lame « IB — $0,25\ \lambda$ » (Ph — $\pi/2 : 100$) qui semble la plus opportune, de même dans l'étude du collagène après la même coloration.

Les striations musculaires sont extrêmement faciles à étudier en contraste de phase, (v. Ralph [274, 316]), et les photographies de cet auteur lui permettent de conclure à la supériorité indiscutable de cette méthode d'observation, de loin supérieure à toutes les colorations qui empâtent les structures. Une lame de phase 0,2 A — $0,25 \lambda$ convient en général à ce travail (lame Ph — $\pi/2 : 20$).

Le tissu nerveux a été également très étudié. On sait que les méthodes usuelles de coloration et d'imprégnation métalliques sont assez difficiles à effectuer correctement et de plus l'action des différents liquides utilisés modifie passablement les structures. Par ailleurs, certains détails sont difficilement colorables et leur existence est de ce fait douteuse pour certains histologistes. Il est donc indispensable d'avoir à sa disposition une méthode d'observation qui élimine *a priori* la plupart des artefacts réels ou supposés. Le contraste de phase est donc un moyen de choix dans l'étude du tissu nerveux et le nombre des publications relatives à son emploi dans ce domaine est assez grand. Hoessly [220] a publié en 1947 une étude comparative en Contraste de phase, microscopie classique et fond noir de tissus cérébraux d'origines zoologiques diverses. Les conclusions principales portent sur la nécessité de comparer les structures ainsi observées. L'étude des modifications dues à la fixation a été assez poussée et pourrait être la base de travaux détaillés sur les artefacts classiques en neuro-histologie. Gatenby et Moussa [211-212], Thomas [227 A], utilisant la méthode de Zernike pour des études du tissu nerveux chez différentes espèces, ont noté les possibilités de travail très précis dans ce domaine difficile à aborder.

En histologie pathologique courante, il ne faut pas perdre de vue la nécessité d'un repérage topographique précis des structures générales de la préparation. Le microscope à contraste de phase ne nous a pas permis d'obtenir avec facilité cette impression préalable et il semble bien établi que toutes les publications ne mentionnent la méthode d'observation que pour les très forts grossissements, ce qui limite sa portée. Pour les recherches de topographie générale, les méthodes de coloration usuelles sont très supérieures, car elles délimitent sans confusion possible les rapports généraux entre les tissus en présence. Les observations à très fort grossissement sont par contre très intéressantes en contraste de phase lorsque l'on veut par exemple examiner avec précision des modifications structurales fines intra cytoplasmiques ou portant sur les fibres de la substance interstitielle. Malheureusement, la difficulté d'obtenir des coupes fines de tissu frais ou coupé après fixation simple et congélation limite les possibilités. Il est cependant des cas où les éléments intéressants sont suffisamment peu modifiés par les méthodes d'inclusion habituelles pour qu'il soit possible d'observer des coupes réalisées avec un matériel classique. C'est par exemple le cas de certaines modifications cellulaires par infection virale, les inclusions parasitaires, les remaniements dégéné-

ratifs de certains parenchymes. Encore dans ce dernier cas faut-il faire preuve de la plus extrême prudence et tenir compte autant que faire se peut, des artefacts dus aux manipulations diverses.

Avec les lames de phase usuelles les coupes à la congélation sont difficiles à observer. Leur épaisseur représente l'obstacle principal, auquel il faut ajouter l'impossibilité de trouver en cas de besoin un milieu de montage suffisamment réfringent sans nécessiter une déshydratation et une imprégnation par un hydrocarbure ou tout autre solvant faisant perdre les avantages de la technique par congélation. Il est alors préférable de travailler sur des étalements par dissociation ou frottis par apposition, méthodes beaucoup plus cytologiques que proprement histologiques. S'il s'agit de coupes à la paraffine, le problème est très différent, l'épaisseur étant moindre et l'utilisation de toute une gamme de milieux possible.

Les milieux liquides sont innombrables et permettent toute la gamme des indices de réfraction entre 1,423 (phosphate tributylque) et 1,70 (di-iodomethane), l'intervalle étant comblé par des corps à indices intermédiaires et leurs mélanges respectifs en proportions variables.

Les milieux solides sont également très nombreux, outre le baume de Canada (1,53), il faut citer le milieu au polystyrène, les polymères d'esters de polyvinyle (chlorure et acetate, leurs mélanges et leur copolymères). Il est impossible de donner des précisions sur tous ces milieux, leur emploi dans des cas précis ne peut être déterminé *a priori*. Il est fonction d'une part de la nature du tissu à examiner et surtout des caractéristiques de la lame de phase utilisée.

Les milieux non aqueux seront employés immédiatement après déparaffinage de la coupe sans rehydratation préalable ; il est bon toutefois d'effectuer un rinçage préalable de la coupe avec le solvant principal du milieu solide utilisé, ou avec le mélange liquide d'indice voulu, afin d'éliminer le toluène. Les tonofibrilles des cellules épithéliales, les striations musculaires, les vacuoles intracytoplasmiques apparaissent avec une netteté particulière. Ces exemples permettent d'utiliser le contraste de phase dans les cas où de telles structures prennent un intérêt dans le diagnostic des lésions. Certains états pathologiques comme les myosites dégénératives, les diskératoses, les intoxications ou certains processus réactionnels particuliers obligent à l'examen minutieux de structures difficilement visibles par les méthodes habituelles parce que nécessitant des colorations très particulières ou difficiles telles les imprégnations métalliques. Le contraste de phase dans ce cas facilite grandement l'examen. Néanmoins, ces exemples montrent le domaine particulier de la morphologie cellulaire qui bénéficie réellement de la méthode de Zernike. Les rapports topographiques entre les différents tissus restent du domaine de l'observation après coloration classique et ceci explique que le contraste de phase soit proportionnellement moins intéressant en histologie pathologique que dans les autres branches de la biologie, telles que la cytologie et l'hématologie.

c) Cytologie

Il n'est pas exagéré de dire que les études cytologiques ont été absolument renouvelées par l'apparition du contraste de phase.

Auparavant, la cytologie était confinée à un petit nombre de laboratoires de recherches, hautement spécialisés du fait de la difficulté des techniques cytologiques, et dont les résultats nécessitaient des études comparatives extrêmement nombreuses, les artefacts éventuels exigeaient une prudence extrême dans les conclusions des chercheurs. A titre d'exemple, on discutait encore il y a peu de temps sur la réalité de l'appareil de Golgi, les publications originales de Golgi étaient source d'interprétations diverses et certains admettaient que le grand cytologiste s'était laissé abuser par des artefacts. La question a été résolue de façon définitive dès les premières vérifications en contraste de phase, sans que le moindre doute ne subsiste : l'appareil de Golgi correspond bien à une structure réelle et non à un artifice. [229, 232, 235, 252, 268.]

On s'explique ainsi les progrès considérables dans les connaissances sur la morphologie fonctionnelle des cellules les plus diverses : l'observation *in vivo* sans coloration des images suffisamment nettes et précises permet, au contraire des méthodes employées auparavant, d'aborder la plupart des examens sans difficulté majeure.

Il est impossible de citer en détail les travaux abordés grâce au contraste de phase. Nous énumérons au hasard les points les plus immédiatement intéressants, en citant les références qui leur correspondent.

Culture de Tissus

Application extrêmement importante du contraste de phase qui permet de suivre les modifications physiologiques et surtout pathologiques, d'étudier les mécanismes de division cellulaire, les dégénérescences, les modifications structurales sous l'effet de différents agents pharmacodynamiques ou autres.

Citons plus particulièrement le travail de Richards [277] où cette question est traitée sur un plan assez général, dans l'ouvrage " *Method in Medical Research* ".

Nous avons eu la possibilité de nous rendre compte de la facilité avec laquelle on peut suivre par exemple les modifications structurales des cellules en culture *in vitro*, sous l'effet d'une infection virale. La microcinématographie de l'évolution du phénomène, dans les films dus à R. Robineaux, est absolument remarquable.

Mitochondries

Les problèmes relatifs au chondriome, dont on connaît les difficultés d'abord par les méthodes classiques, ont été particulièrement étudiés

par A. von Albertini [198] et surtout par Jones [251, 253, 254] et Zollinger [294, 296, 297, 298]. Il est certain que les expériences ainsi faites sont très supérieures quant aux conclusions permises à tous les résultats antérieurs. Il a été ainsi possible de déterminer la pression osmotique à l'intérieur de ces particules.

Structures Nucléaires

Les images de mitose et les formations chromosomiques ont fait l'objet des études de Hughes [251], Kauffman [257]), les autres structures diverses, également par Hughes [254].

Cytologie médicale.

Les applications proprement médicales de la cytologie en contraste de phase sont désormais bien établies et leur importance légitime une étude plus approfondie. Ce sont tout d'abord les examens à l'état frais qui ont bénéficié de la méthode, se substituant simplement à la microscopie classique, simples transpositions de techniques déjà utilisées depuis longtemps. Les spermogrammes par exemple, étudiés particulièrement par Farris [237, 238, 239], par Fossel [242], ce qui permet une étude morphologique en même temps que la simple numération. Une précaution s'impose toutefois si l'on veut étudier la morphologie de ces éléments très mobiles, consistant à adjoindre au liquide de la suspension une certaine quantité d'une substance à haute viscosité. On peut très bien utiliser la polyvinylpyrrolidone en solution à 5 % (subtosan) qui ne nuit pas à la vitalité des éléments : déposer successivement sur la lame une goutte de Subtosan additionné de 5 0/00 de NaCl et une goutte de suspension des spermatozoïdes, couvrir d'une lamelle et luter s'il y a lieu. Les mouvements sont suffisamment ralentis pour permettre une étude morphologique.

L'importance prise par la cytologie des produits de desquamation, en particulier des frottis vaginaux et cervicaux et surtout pour les recherches de cellules anormales a suscité de nombreux travaux à ce sujet. Il est certain que l'étude des structures nucléaires est un des signes les plus importants du diagnostic de malignité de ces éléments. Les rapports sur ce sujet sont très nombreux dans la bibliographie : Citons les travaux de A. von Albertini [228], Glatthar [245], Roth [279], Runge [280, 281], Wied [285], Zinser [290]. Le même problème a été traité pour l'étude cytologique d'autres produits : Firor [241], Henning [248], Ludford et Smiles [260], Lüdin [262], Zinser [289] sur des sujets généraux, Hoffman et Rottino [249], Lüdin [263] sur le problème de la lymphogranulomatose.

Nous avons nous-même utilisé le contraste de phase comparative-ment aux colorations pour l'étude cytologique de frottis divers en vue de

la recherche des signes de malignité. Un fait d'extrême importance est à souligner dès l'abord : l'identification correcte des cellules malignes nécessite un entraînement préalable assez long, comparable à celui que demande l'étude des frottis colorés. Les aspects sont évidemment très différents dans les deux cas, les anomalies visibles relèvent d'un autre ordre. L'emploi de colorations différentielles permet de dépister à faible grossissement les éléments *a priori* pathologiques, le grossissement supérieur précise ensuite l'existence des anomalies nucléaires ou cytoplasmiques. En contraste de phase au contraire, la structure seule est révélée et un grossissement assez fort est toujours nécessaire pour révéler la présence d'aberrations structurales surtout nucléaires. L'œil est beaucoup moins attiré par les différences de luminance que par les différences de teinte et il est certain que dans les débuts du moins, la recherche des éléments anormaux est plus longue, mais par contre, la précision des images est plus grande et n'est plus soumise à la qualité de la coloration. Les structures *fin*es sont certainement mieux visibles. Il faut toutefois préciser que l'examen est tout aussi long que dans la méthode usuelle.

d) Hématologie

La facilité d'obtenir des préparations vitales avec les éléments sanguins a très tôt incité à l'utilisation du contraste de phase dans les observations hématologiques, qu'il s'agisse de sang ou de moelle osseuse, de ponction de ganglions... Des travaux particulièrement intéressants ont été publiés par Albertini, Barer, Richards, Bessis, Crossmon, Cazal et Izarn, Möschlin, et de multiples références à des travaux semblables sont citées dans la plupart des ouvrages sur le contraste de phase.

Les travaux de Bessis, Bessis et Locquin, Bessis et Bricka fournissent de nombreuses bases techniques servant à l'obtention d'images correctes.

Préparations vitales.

Il faut se souvenir que dans ce type de préparations, les éléments cellulaires ne sont pas étalés comme sur un étalement usuel fixé par dessiccation. L'épaisseur beaucoup plus grande des cellules fournit un trajet optique assez considérable, d'autant plus que les hématies et les leucocytes, surtout granuleux, sont doués d'un indice de réfraction élevé. A titre indicatif, l'indice du plasma sanguin est approximativement de 1,34 et celui des cellules de 1,53 pour les hématies et en moyenne de 1,47 pour les autres cellules, les granulations éosinophiles étant encore plus réfringentes (1,56 environ). Il en résultera des trajets optiques élevés si ces éléments sont observés dans leur milieu normal, le plasma, et le contraste sera élevé, trop même pour montrer facilement la structure interne cytoplasmique ou nucléaire avec les lames de phase à contraste moyen utilisées habituellement

Soit une cellule d'indice moyen 1,53 (hématie) dans un liquide d'indice 1,34, cas habituel. L'onde diffractée résultante aura pour paramètres :

$$\text{Phase : } \varphi_d = \frac{\pi \Delta}{\lambda} + \frac{\pi}{2} = 1,71 + 1,57 = 3,28 \text{ rad.}$$

$$\text{Amplitude : } I_d = M. 2 \sin \frac{\pi \Delta}{\lambda} = 0,91 . 2 = 1,82 M$$

Inutile de préciser que le cas théorique est fort éloigné de ces résultats.

L'emploi d'une lame de phase usuelle de type $\text{Ph} - \pi/2$ sera particulièrement impropre. Il en résultera un effet de cerne très important qui gênera les observations. Les aberrations inévitables de l'optique ajouteront à ce phénomène leur action propre. Les détails de structure cytoplasmique seront pratiquement invisibles, et seuls les bords de la cellule apparaîtront avec une netteté suffisante. Par ailleurs le contraste sera assez élevé, mais les contrastes différentiels dus aux particules cytoplasmiques élémentaires seront très faibles (cas des réticulocytes) et noyés dans les franges de diffraction et d'aberration inévitables avec des trajets optiques aussi élevés. La méthode ne sera pas sensiblement meilleure que l'éclairage oblique ou la défocalisation. Il est préférable, quand la chose est possible, de recourir à l'examen après fixation, ce qui permet de trouver un milieu d'indice convenable, ou de choisir une lame de phase appropriée. Dans le cas présent, une lame — $\text{Ph} - \pi/2 : 40$ pourrait éventuellement convenir. Enfin, la solution la plus immédiate est de mélanger au milieu de montage un produit à grosse molécule comme la polyvinylpyrrolidone, ou les mélanges à base d'alcool polyvinylique. Il est possible d'accroître ainsi de façon sensible les indices sans trop modifier la pression osmotique des milieux.

La diminution du trajet optique par réduction de l'épaisseur des éléments est également un moyen utilisable. Un étalement d'épaisseur

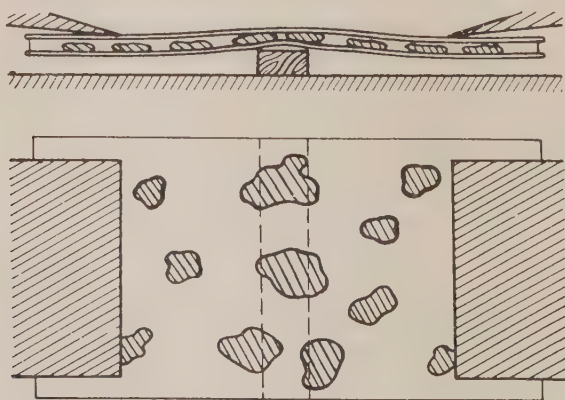


Fig. 25. — Exemple de méthode de compression.

unicellulaire est certes une nécessité, mais on peut pousser plus loin la finesse de la préparation. Différents modes de compression sont donnés par Bessis dans ses différentes publications. Une goutte de suspension cellulaire suffisamment petite s'étale sous la lamelle et la tension superficielle applique le couvre-objet avec une force compressive notable.

La technique à la gélatine semble aussi d'un assez grand intérêt dans ce sens : la suspension cellulaire est déposée sur une lame enduite d'une solution de gélatine à 5 % bien séchée au préalable. Lors du dépôt de la suspension, on recouvre d'une lamelle. Progressivement, la gélatine absorbe l'eau du milieu en gonflant et aplatit ainsi les cellules contre la lamelle.

Le cas des leucocytes est heureusement moins extrême et d'ailleurs beaucoup plus fréquent. C'est surtout la lignée blanche qui est l'objet des observations dans les cas pathologiques. L'indice moyen de ces cellules étant plus faible, il en résultera une facilité d'observation plus grande. Hormis les granulations éosinophiles, les indices moyens se situent autour de 1,47, mais l'intensité de l'onde diffractée à leur niveau oscillera autour d'une valeur approximativement égale à celle de la composante transmise. A priori donc, le taux de transmission de la zone conjuguée ne devra pas trop s'éloigner de l'unité dans le cas de ces préparations. L'utilisation d'une lame $\text{Ph} - \pi/2 : 50$ réalise un bon compromis entre le contraste de l'ensemble de la cellule par rapport au reste du champ et les détails intracytoplasmiques dans le cas du contraste sombre. L'observation de ces préparations vitales est facilitée par le fait que les mouvements amoeboïdes des cellules fait constamment varier les épaisseurs et les positions relatives des différentes structures constitutives. Les voiles hyaloplasmiques qui apparaissent transitoirement, d'épaisseur très faible, permettent de voir les granulations (mitochondries ...) avec une grande facilité. Lorsque l'étude porte sur ces organites, la lame de phase pourra être différente. Dans ce cas, une lame de caractéristiques $\text{Ph} - \pi/2 : 10$ est particulièrement intéressante. Nous retrouvons ici une notion déjà implicite dans les calculs théoriques : plus la particule étudiée est petite et de trajet optique faible, plus le coefficient de transmission au niveau de la zone conjuguée doit diminuer pour conserver un contraste satisfaisant.

Préparations Fixées.

Lorsque l'observation vitale n'est pas indispensable, les préparations fixées permettent une plus grande liberté de technique et sont souvent d'une interprétation plus facile, compte tenu des modifications dues à l'agent fixateur employé. La meilleure fixation est réalisée par les mélanges osmiés, ainsi que nous l'avons déjà signalé, mais la simple dessiccation peut fournir des résultats suffisants dans les examens courants. Cette dernière méthode est du reste la plus employée du fait de sa facilité.

Dans ce cas, les milieux de montages, s'ils sont aqueux, doivent être isotoniques si l'on veut éviter un éclatement des hématies.

La fixation peut être très différente selon les travaux envisagés. Une simple dessiccation sera toujours suffisante pour l'étude de hématies, qu'il s'agisse de recherche des réticulocytes ou de la présence d'hématozoaires.

L'examen des leucocytes peut évidemment se faire grâce à la même méthode, mais les modifications de structure fine nécessitent un recours à des fixateurs proprement dits, aussi précis que possible. Les mélanges osmiés sont sans aucun doute préférables à toutes les autres formules.

La technique la plus simple consiste à fixer le frottis encore humide en l'exposant aux vapeurs d'une solution de Os O_4 à 2 %. Elle est très suffisante et les mélanges plus complexes ne semblent pas avoir de supériorité bien nette sur elle. Leur emploi par immersion du frottis nécessite une quantité assez grande de produits coûteux et leur conservation en cours d'utilisation est toujours assez précaire du fait de l'introduction inévitable de matière organique tendant à décomposer fortement l'acide osmique.

La fixation des frottis hématologiques a quelquefois été effectuée grâce au mélange Alcool-Ether utilisé pour les frottis à examiner selon la méthode de Papanicolaou. Il est certain que ce procédé ne donne pas de meilleurs résultats que la simple dessiccation, et de ce fait est une complication inutile.

La fixation ne modifiant pas sensiblement les indices de réfraction des constituants cellulaires, les mêmes problèmes se retrouveront inchangés par rapport aux préparations vitales, mais les possibilités dans le choix de milieux de montage seront incomparablement plus étendues. Il sera possible d'utiliser des mélanges aqueux de pression osmotique assez variée, ainsi que des formules à base de solvants divers, ceci est surtout intéressant pour les hématies dont le fort indice de réfraction ne permet guère l'utilisation des milieux à faible indice.

Bessis et Locquin [320 D] attirent à juste titre l'attention sur le fait que certains milieux de montage peuvent modifier l'indice de réfraction des cellules qui y sont incluses. Les milieux aqueux à base de pseudo-solutions de grosses molécules (polyvinylpyrrolidone, carboxyméthyl-cellulose, alcool polyvinylique) ne modifient pas cet indice, mais les milieux contenant des solvants pouvant se substituer à l'eau d'imbibition des gels cytoplasmiques après fixation, le modifient dans certains cas considérablement. Ce phénomène entre donc assez fortement en ligne de compte avec les hydrocarbures utilisés comme solvants dans certains milieux, mais l'effet n'est pas immédiat, le réajustement de l'indice considéré est progressif et varie du reste avec les techniques de montage utilisées.

Lors du montage direct de frottis sanguins fixés par dessiccation dans des liquides non miscibles à l'eau (nitrobenzene, tricresylphosphate, butylphthalate, anisole, bromonaphtalène...) il ne semble pas que la modification d'indice soit considérable. Nous n'avons personnellement pas constaté de changement considérable dans l'image obtenue soit immédiatement, soit après 24 heures d'attente.

Les milieux de montage doivent être différents si l'on désire étudier les leucocytes ou les hématies. Pour les éléments blancs, une fixation préalable est préférable et le meilleur fixateur est certainement l'acide osmique (tetraoxyde d'osmium) sous formes de vapeurs, employé sur un frottis encore humide. Le montage se fait dans un milieu aqueux, soit le soluté physiologique ou ses variantes, soit dans un milieu semi-solide. La glycérine gélatinée peut être utilisée, mais nous préférons un mélange à base de carboxyméthylcellulose de forte viscosité, dont on peut faire varier l'indice de réfraction par addition de dioxane ou de glycérine. On emploiera par exemple la formule :

Eau dist. : 50 cc
Blanose R 190 (1) : 0,75 g

comme milieu de base, en ajoutant une trace de thymol comme conservateur. L'adjonction de glycérine (jusqu'à 25 %) permettra d'ajuster l'indice de réfraction à la demande. Ce milieu est assez fortement visqueux, s'utilise sans chauffage préalable. Pour les préparations à conserver, un lutage est cependant nécessaire, afin d'éviter l'évaporation.

Les hématies pourront être observées dans un liquide d'indice assez élevé, par exemple l'anisole ou le nitrobenzène. L'image sera assez peu contrastée mais les détails intracellulaires pourront être mis en évidence très facilement (s'ils existent) et on ne sera pas gêné par les effets de cernes dus à un trajet optique différentiel trop important. Il sera naturellement possible d'ajuster l'indice du milieu utilisé par adjonction de benzoate de méthyle ou de bromobenzène qui permettront d'assez grandes variations dans les résultats obtenus, compte tenu des paramètres de la lame de phase utilisée.

Dans le cas où un milieu solide est préférable, les acétates et chlorures de polyvinyle permettront une solution du problème. Mis en solution dans la méthyléthylcétone avec adjonction d'une légère quantité de plastifiant comme le phosphate tributylque, ils fourniront des milieux d'indice variant entre 1,46 et 1,53 après séchage. On emploiera par exemple la formule :

Afcovyl P5 (2) : 2 g
Tributylphosphate : 0,5 g
Méthylethylcétone : 20 cc

(1) Blanose R 190 est une variété de Carboxyméthylcellulose purifiée à haute viscosité, fabriquée en France par les Ets Novacel.

(2) Afcovyl P 5 copolymère d'acétate de polyvinyle et de Chlorure de Polyvinyle fabriqué par Pechiney.

milieu de base auquel on ajoutera un milieu semblable contenant du chlorure de polyvinyle si l'indice obtenu semble un peu faible.

Tous ces milieux non aqueux seront utilisés de préférence sans passage intermédiaire par un liquide déshydratant, simplement en les déposant sur un frottis bien sec. Une lamelle recouvrira la préparation comme habituellement.

On pourrait être tenté dans certains cas de supprimer la lamelle de verre en se contentant de l'effet protecteur du vernis solidifiable utilisé comme milieu. Ceci est formellement contre-indiqué. D'une part, l'épaisseur ainsi réalisée est trop petite et les objectifs à sec ne sont pas corrigés pour les épaisseurs obtenues, d'autre part, les irrégularités de surfaces produisent en contraste de phase des zones claires et sombres très gênantes, même en observation à très fort grossissement par un objectif à immersion.

e) Bactériologie, mycologie et virologie

Il est très facile de mettre en évidence les microorganismes bactériens en contraste de phase, simplement à l'état frais plutôt qu'après fixation, et surtout lorsque cette fixation est faite à la chaleur comme c'est le cas habituel, produisant ainsi des rétractions parfaitement visibles.

Les germes de grande taille sont déjà bien visibles avec une lame de phase Ph — $\pi/2$: 20, mais une lame plus absorbante est encore meilleure dans certains cas. Il ne faut pas oublier que l'indice de réfraction étant en général faible au niveau des cytoplasmes bactériens, les dimensions réduites des organismes donnent des trajets optiques particulièrement faibles, nécessitant un coefficient de transmission de la zone conjuguée suffisamment petit. Bennett [14] conseille, dans le cas des éléments de petite taille une lame 0,07 A + 0,25 λ (Ph + $\pi/2$: 07) utilisable également pour rendre visibles les détails internes des bactéries, le contraste clair étant à son avis supérieur, surtout pour les détails intracytoplasmiques.

Avec un équipement comprenant un condenseur à long foyer, il devient possible d'observer directement des germes en culture sur gélose dans une boîte de Petri si la couche de gélose n'est pas trop épaisse.

Une optique à contraste de phase correctement utilisée montre des détails dans la plupart des cellules microbiennes examinées, au contraire des préparations usuelles, simplement à l'état frais. Mais il est indiscutable ici que le contraste clair est supérieur au contraste sombre.

Les problèmes de morphologie bactérienne ont été complètement modifiés par la possibilité d'atteindre les structures protoplasmiques sans traumatisme préalable. La découverte de formation nucléaire a été confirmée en contraste de phase, mais les aspects cytoplasmiques propre-

ment dits sont relativement encore plus étudiés actuellement. Les travaux de Pijper avaient abouti en 1946 à la constatation de la nature artificielle des cils bactériens, à la suite d'observations en fond noir, en milieu visqueux. Pour cet auteur, les mouvements des bactéries étaient dûs à des phénomènes de torsion et de rotation hélicoïdale des éléments, et les cils colorés par différentes méthodes (Casares-Gil par exemple) n'étaient que des artefacts. Pijper a repris ces travaux à l'aide du contraste de phase et parallèlement, Richards réalisa une étude microcinématographique de *Proteus* et *B. Subtilis*. Les conclusions actuelles, encore provisoires semblent bien confirmer les premières impressions de Pijper sur la non existence de cils bactériens.

Toujours en préparation non colorée, il est parfaitement possible de vérifier l'existence d'une capsule autour des corps microbiens proprement dits, dans le cas du pneumocoque par exemple, et de façon infiniment plus facile que par les méthodes de coloration difficiles à bien réussir.

Bactériologie médicale.

Les problèmes de détermination des germes présents dans un produit septique nécessitent un examen morphologique approfondi avant et pendant les cultures et repiquages. Généralement, cet examen est fait après coloration par la méthode de Gram, l'examen à l'état frais n'étant pratiqué qu'assez exceptionnellement, à tort du reste. On lui reproche de n'apporter qu'un nombre insuffisant de renseignements utiles, essentiellement sur la mobilité et accessoirement sur la morphologie approximative des bactéries étudiées. Il faut reconnaître qu'avec une optique microscopique usuelle, les formes des particules en suspension dans le liquide examiné apparaissent mal. En contraste de phase au contraire, une étude morphologique poussée peut résulter d'un simple examen à l'état frais, sans précaution spéciale. Les germes sont simplement déposés dans leur liquide de culture entre lame et lamelle. Il est alors facile de différencier les formes coccobacillaires des cocci véritables, de voir les capsules, et les germes à morphologie particulière sont facilement repérés. Nous pensons particulièrement aux corynebactéries dont le diagnostic, pratiquement toujours morphologique dans les cas urgents, est la source de difficultés particulières.

Des références bibliographiques particulièrement intéressantes sur lesquelles il est impossible de s'étendre ici, sont à citer en particulier. L'application du contraste de phase à l'observation vitale des bactéries a fait l'objet d'un important travail de Poetschke [350] sur les conditions pratiques d'expérimentation. De leur côté, Tulasne [361], Richards [356-355] et Winkler [365] ont dégagé les modalités d'application de la méthode. Mais du point de vue médical, sont à retenir surtout les applications à la recherche de *Corynebacterium Diphtheriæ* et des mycobactéries alcool-acido résistantes.

Les tentatives de détermination de la présence du bacille dyphtéri- que ont fait l'objet des travaux de Kludas et Schmager [339-358]. Sans donner de réponse absolument définitive, les auteurs pensent que de toute façon, l'observation morphologique immédiate est grandement facilitée par l'emploi du contraste de phase, et permet un diagnostic présumptif plus facile que le frottis coloré seul. Personnellement, quelques expériences nous ont permis effectivement de retrouver dans un mélange de germes quelques amas de corynebactérium épars dans une pullulation microbienne considérable, et de conclure présomptivement à leur nature saprophytique, ce que la culture a confirmé. Nous n'avons pas eu l'occasion d'observer de bacille dyphtéri- que vrai dans des exsudats pharyngés, et il ne nous est donc pas possible d'évaluer la valeur exacte de la méthode qui semble *a priori* aussi valable et plus aisée que le frottis coloré classique.

La recherche des bacilles alcool-acido résistants a fait l'objet de recherches, dans l'espoir de faciliter leur mise en évidence. Il ne peut s'agir ici que de préparations colorées, la caractéristique de ces germes étant précisément leur résistance à la décoloration. Dans ces conditions, l'emploi du contraste clair est nécessaire, après coloration par la méthode de Ziehl classique, suivie d'une coloration du fond par un bleu basique ou encore mieux, un vert. Il y a intérêt à ajouter un filtre rouge au montage, afin d'augmenter le contraste. Théoriquement, il est indispensable d'utiliser une lame de phase de type Ph. + $\pi/2$ avec un milieu de montage moins réfringent que le germe recherché dont l'indice est précisément assez élevé, surtout après coloration. L'emploi des lames usuelles donnant au contraire dans les mêmes conditions un contraste sombre n'est possible que par le choix d'un milieu très réfringent, comme le monobromonaphtalène ou le di-iodométhane. Nous avons tenté cette expérience, en pensant à la rareté relative des équipements à contraste clair. Les résultats fournis par différents objectifs ont été négatifs, ou du moins, pratiquement inutilisables. Il ne faut pas oublier en effet que les particules de petite taille comme les bactéries demandent un coefficient de transmission au niveau de la lame de phase assez bien déterminé pour apparaître avec un contraste suffisant, et à plus forte raison lorsqu'il s'agit de conditions d'emploi assez aberrantes, comme c'était le cas de notre tentative. Cet essai serait à reprendre avec une gamme d'objectifs à taux d'absorption différents, mais il reste à peu près certain que l'utilisation correcte d'une lame à contraste clair doit donner des résultats extrêmement intéressants et applicables à l'examen de routine de la recherche du bacille de Koch après coloration habituelle, l'aspect se rapprochant, comme nous l'avons dit d'un effet de fluorescence, sans nécessiter de modification dans la préparation des étalements colorés, ni l'emploi de lumière violette ou ultraviolette.

Virologie.

Hormis le cas des particules virales appartenant aux groupes ambigus des *Rickettsia* et autres microorganismes dont la classification hésite entre la nature bactérienne ou virale, il n'est pas question de mettre en évidence les particules élémentaires proprement dites. Pas plus que la microscopie classique, le contraste de phase n'est doué d'un pouvoir séparateur transversal suffisant pour atteindre des particules de quelques μ .

Les applications à la virologie sont donc limitées à la constatation de la présence des inclusions intracellulaires que l'on sait d'ailleurs voir après coloration par des méthodes de surimprégnation (méthode de Mann, de Morosow...), mais il faut reconnaître que les progrès sont considérables. A la place d'un empatement par un colorant concentré à action plus ou moins élective, l'image en contraste de phase met en évidence sans ambiguïté la présence des corps d'inclusion. Les travaux et les publications de Angulo et coll. [321, 322, 323] qui ont porté sur ce sujet, mettent en évidence la présence de ces corpuscules dans des coupes histologiques non colorées d'organes infectés par la fièvre jaune, l'herpes, les ornithoses, avec comme particularité, l'emploi d'une lame de phase à contraste clair $\text{Ph} + \pi/2 : 14$. Le diagnostic de la rage, de la vaccine et de diverses viroses végétales a été tenté dans les mêmes conditions et il semble bien que cette méthode soit susceptible de supplanter les techniques usuelles de coloration assez difficiles à exécuter correctement.

Pour les particules de taille inframicroscopiques, les études théoriques de H. Osterberg [78] donnent certains espoirs grâce à la mise en œuvre de modalités apparentées à celles de l'ultramicroscopie. Ceci mis à part, il semble que pour les objets juste à la limite de résolution, les lames de phase $\pi/2$ ne soient pas toujours les plus avantageuses [336]. Hofer et Richards qui ont réussi à voir les modifications de certaines bactéries sous l'influence de leur phage, ainsi que le phage lui-même, signalent l'emploi favorable d'une lame $\text{Ph} + \pi/5 : 17$ (0,17 A — 0,1 λ).

Autres microorganismes.

Le problème de la morphologie des microorganismes est aisément résolu par le contraste de phase. Il est donc inutile d'insister sur les avantages de son emploi dans les cas où précisément cette morphologie est une clé importante du diagnostic différentiel, tant dans les liquides pathologiques que sur les milieux de culture. Le problème est le même que pour les bactéries en général, mais certains aspects diffèrent avec le microorganisme étudié.

Les spirochètes ont fait l'objet d'études dès les premières réalisations d'objectifs à contraste de phase, puisque dès 1942, Burch et Stock [24] présentaient déjà des images de spirochètes saprophytes. Par la

suite, les auteurs se sont appesantis sur l'étude de ces organismes dont la biologie et mal connue malgré des études répétées et approfondies. Il faut citer les travaux de Dyar [330], de Delamater et coll. [328, 329] sur différents organismes saprophytes et libres, et ceux de Perrey [346], de Poetschke et Lewandowski [351] sur les tréponèmes.

Les auteurs ont tenté de déterminer le cycle d'évolution de ces organismes et certaines réponses partielles ont déjà pu être données [329].

L'observation des filaments myceliens permet l'identification, du moins partielle de la nature du champignon en cause dans une infection et le contraste de phase est d'un intérêt considérable dans ce domaine encore plus que dans les autres. Mais ici, les trajets optiques des particules sont assez grands et il est nécessaire de prendre quelques précautions si l'on veut voir tous les détails de structure. Les travaux font mention de lames de phases à caractéristiques inhabituelles particulièrement adaptées à ce genre d'observation. D'une façon générale, les auteurs américains recommandent l'emploi de lames du type B (type — Ph. de Locquin) qui mettent mieux en évidence les structures internes. Les lames de ce type n'étant pas disponibles en Europe, nous n'avons pas eu l'occasion d'expérimenter sur ce point mais il est certain que l'emploi des lames classiques à contraste sombre donne des images assez mauvaises, à peine supérieures à l'emploi d'une ouverture numérique abaissée par la fermeture du diaphragme d'un microscope classique.

Les autres parasites sont évidemment au même titre visibles par la méthode. Les hématozoaires de paludisme, parfaitement identifiables exigent les précautions un peu particulières relatives à l'observation des hématies et des détails internes qu'elles peuvent contenir : indice de réfraction correct du milieu de montage, contraste pas trop élevé... Une seule référence bibliographique consacrée à ce problème a été retrouvée. Il s'agit de la publication de Trager [360]. Il ne semble pas qu'il s'en soit suivi d'utilisation vraiment systématique malgré la simplification apportée par la suppression de la coloration des frottis, ce qui est très regrettable.

Il reste à citer enfin une application de routine particulièrement fréquente. Il s'agit de la recherche de *Trichomonas Vaginalis* à l'état frais sur les étalements de liquide vaginal. Zinser, dès 1947, publia ses résultats [366] et nous avons personnellement eu l'occasion répétée d'utiliser le contraste de phase pour la recherche de ce parasite. Il est hors de doute qu'il s'agit de la méthode la plus facile et la plus sûre. L'examen à l'état frais *in vivo*, sans précaution spéciale entre lame et lamelle, à l'aide d'un objectif à contraste moyen d'au moins 60 de grossissement propre n'offre aucune difficulté. On voit parfaitement les mouvements flagellaires et intracytoplasmiques et aucune erreur n'est possible. C'est peut-être l'examen courant le plus immédiatement bénéficiaire de la méthode, permettant une réponse extrêmement rapide au cours même d'une consultation gynécologique.

CONCLUSIONS

L'examen microscopique dans le domaine de la biologie est une méthode extrêmement banale, mais l'on sait les difficultés auxquelles se heurte l'observateur.

La nécessité de plus en plus grande des observations vitales où la préparation est libérée des artefacts de la fixation et de la coloration se heurtait depuis longtemps à l'inexistence d'une méthode réellement valable pour les structures de petite taille. Les artifices utilisés traditionnellement : fermeture du diaphragme du condenseur, éclairage latéral du microscope, n'étaient, malgré les services qu'ils rendaient, que des solutions de pis-aller, où les images ne gagnaient en contraste qu'autant que les systèmes optiques perdaient leur pouvoir résolvant.

Les travaux de Zernike ont permis sur le plan théorique et encore plus dans le domaine de l'application, de se libérer de l'emploi systématique des reliquats d'aberrations des systèmes optiques, dont les constructeurs tendaient de plus en plus à réduire l'importance. Le contraste de phase permet l'observation vitale dans des conditions pratiquement idéales, car il autorise d'une part l'emploi du pouvoir résolvant maximum du système optique utilisé, et d'autre part la visibilité des structures cellulaires même très fines au cours du développement, de la division — et même de la dégénérescence et de la nécrose — des éléments examinés.

A ces avantages correspondent naturellement des inconvénients qu'il faut connaître et auxquels il faut se soumettre.

Un microscope ordinaire est facile à régler, et fonctionne à peu près même en dehors de tout réglage. Sa bonne volonté est même extraordinaire.

Le contraste de phase est beaucoup plus exigeant, un réglage défectueux peut faire perdre tous les avantages de la méthode et une foule de facteurs influent sur la qualité des images obtenues.

Par la nature même des phénomènes optiques qui prennent part à la formation de l'image, il est indispensable de connaître au moins qualitativement les effets de chacun des facteurs susceptibles de modifier les contrastes, et de remédier au moins partiellement aux difficultés rencontrées au cours de ce genre d'observation microscopique.

C'est à ce prix que les richesses extraordinaires de la méthode du contraste de phase pourront être mises à profit.

Vu :

LE DOYEN :

L. BINET

Le Président du Jury :

A. STROHL

Vu et Permis d'imprimer :

LE RECTEUR DE L'ACADÉMIE DE PARIS,

Le Vice-Président du Conseil de l'Université de Paris :

L. BINET

INDICES DE REFRACTION DES MILIEUX DE MONTAGE

L'astérisque indique un indice légèrement variable selon l'échantillon

1. — LIQUIDES

Eau distillée	1,333
Solution de Tyrode	1,335
Méthyl Cellosolve (1)	1,403
Huile Silicone 9996-100	1,403
Dioxane	1,422
Glycérine	1,46*
Xylène	1,46
Huile de paraffine	1,46*
Huile de Ricin	1,477
Anisole	1,517
Huile de Cèdre	1,52*
Benzoate de Méthyle	1,526
Salicylate de Méthyle	1,536
Bromure d'Ethyle	1,538
Nitrobenzène	1,553
Bromobenzène	1,560
Anéthole (2)	1,562
Monobromonaphtalène	1,66
Iodure de méthyle	1,76

2. — SOLIDES

Glycérine gélatinée	1,47*
Vinylite X (3)	1,47
Isobutyl-méthacrylate	1,477
Euparal	1,48 - 1,53
Acétate de polyvinyle (4)	1,467
Chlorure de polyvinyle (4)	1,53
Camsal	1,48
Lucite (5)	1,50
Siloxane D C 804 (6)	1,515
Damar	1,52
Baume du Canada	1,53*
Styrax	1,57 - 1,63
Polystyrène	1,59
Arochlor	1,63

3. — MELANGES D'INDICE VARIABLE SELON LA COMPOSITION

Eau distillée. - Glycérine	1,33 - 1,44
Phosphate tributylque - phosphate triorthocresylique . .	1,423 - 1,556
Solution d'Arochlor dans l'huile de paraffine	1,49 - 1,63
Huile de paraffine et Bromonaphtalène	1,49 - 1,62
Ether monobutylque du diéthylèneglycol et aldehyde cinnamique	1,44 - 1,62
Ether monobutylque du diéthylène-glycol et chloronaph- talène	1,440 - 1,628
Bromonaphtalène et Iodure de méthylène	1,66 - 1,70
Bromonaphtalène et chloronaphtalène	1,632 - 1,656
Bromonaphtalène et ac. heptanoïque	1,423 - 1,658
Mesitylène et propionate d'Ethyle	1,384 - 1,493
Phtalate de n-Butyle et propionate d'Ethyle	1,384 - 1,498

4. — QUELQUES FORMULES

Milieu d'Apathy

Gomme arabique :	50 g
Saccharose :	50 g
Eau :	50 g

ajouter une trace de thymol pour éviter les moisissures. Ce milieu devient très dur en quelques jours. Indice de réfraction variant de 1,42 à 1,52 selon les origines de la gomme et également du saccharose commercial utilisé.

Sirop de levulose

Levulose :	30 g
Eau :	20 cc

dissoudre en tiédissant le mélange. Indice 1,43.

Milieu au polystyrène

Polystyrène :	10 g
Phtalate de dibutyle (plastifiant) :	5 cc
Xylène :	35 cc

devient assez dur rapidement et reste parfaitement transparent. Indice voisin de 1,57.

Milieu à l'alcool polyvinylique

Alcool polyvinylique :	2 g
Acétone à 70 % :	7 cc
Glycérine :	5 cc
Ac lactique :	5 cc
Eau :	10 cc

Ajouter lentement l'acétone à la résine, puis verser les autres liquides goutte à goutte. Le milieu reste assez mou. S'il tend à rester trouble, le chauffer légèrement jusqu'à éclaircissement. Indice 1,382.

Milieu C-M

Méthyl cellulose	:	5 g
Carbowax 4000	:	2 g
Diéthylène Glycol	:	1 cc
Alcool éthylique à 95°	:	25 cc
Acide lactique	:	100 cc
Eau	:	75 cc

Mélanger le méthylcellulose et l'alcool puis ajouter le reste des produits. Ce milieu assez fluide demande séchage à l'étuve. Son indice est de 1,428.

Ces formules sont extraites des publications de Lillie, Bradford et Schwartz, Gray et Wess, Greco, Clark et Morishita...

Certains constituants demandent quelques indications supplémentaires.

(1) Méthyl Cellosolve est le nom commercial américain de l'éther monométhyllique du glycol éthylénique (glycol ordinaire).

(2) Synonyme de 1 méthoxy 4 propenyl-benzène.

(3) Vinylite X (connu aussi sous les noms de Alvar, Butacite) est le Polyvinylbutyral.

(4) Le mélange des deux produits donne les indices intermédiaires selon proportion.

(5) De la famille des Methacrylates (methacrylate de methyle) fabriqué aux Etats-nis par Du Pont de Nemours.

(6) Le Siloxane D C 804 est une silicone fluide.

Ces indications sont données aux fins d'identification. Les correspondances exactes avec les produits disponibles en France sont très nombreuses, mais n'intéressent que la grosse industrie chimique. Il est des cas où le produit équivalent à celui cité n'existe pas dans la production française (tel le Carbowax 4000). Aussi n'insistons-nous pas sur certains milieux intéressants mais irréalisables actuellement faute de produit de base.

OUVRAGES THEORIQUES ET DE PORTEE GENERALE

- 1 ANONYME. — Report of paper (by Zernike) on the phase-contrast Method. *Quekett Micr. Club*, 1934, 1, 75-76.
- 2 BACHRACH M. — Method for observing surface structures. *Jl. Biol. Photogr. Ass.* 1946, 14, 157-162.
- 2 BALLERINI. — Teoria elementare del microscopio a contrasto di fase, *Galileo Nws*, 1948, 1, 14-20.
Même titre in *Nuovo Olmento*, 1946, 5, 121-132.
- 4 BARER R. — A Vector theory of Phase contrast and Interference Contrast.
I Positive Phase Contrast *J.R. Micro. Soc.* 1952, 72, 10.
II » » » » » » 1952, 72, 81.
III Negative » » » » » 1953, 73, 50.
- 5 BARER R. — Phase contrast terminology. *Mikroskopie*, 1952, 7, 410.
- 6 BARER R. — A comprehensive theory of phase contrast and interference microscope. In *Colloque Contraste de Phase Rev. Optiq.* Paris, 1952.
- 7 BARER R. — Recent advances in microscopy : Phase Contrast Microscope : *Brit. Sci. News*, 1948, 1 (9), 10-13.
- 8 BARER R. — Variable color amplitude phase contrast microscopy : *Nature*, 1949, 164, 1.087-1.088.
- 9 BARER R. — Progress in practical microscopy. *J.R. Mic. Soc. of G.B.*, 1951, 71 (3), 307-337.
- 10 BENFORD James, SEIDENBERG R.-L. — Phase contrast microscopy for ouaque Specimens. *J. Opt. Soc. Am.*, 1950, 60, 259-314-316.
- 11 BENNETT A.-H. — Phase difference microscopy for transparent objects. *Anat. Record*, 1944, 89, 547.
- 12 BENNETT A.-H. — The Phase Contrast Microscope. *J. Washington Acad. Sci.*, 1948, 38, 30.
- 13 BENNETT A.-H., JUPNIK H., OSTERBERG H. RICHARDS O.-W. — Phase microscopy. *Trans. Amer. Micro. Soc.*, 1946, 65, 99-131.
- 14 BENNETT A.-H., JUPNIK H., OSTERBERG H., RICHARDS O.W. — *Phase Microscopy, Principles and applications*. N.Y. John Wiley and Sons, London, Chapman and Hall.
- 15 BENNETT A.-H., WOERNLEY D.-L., KAVANAGH A.-J. — Ultraviolet Phase Microscopy. *J. Opt. Am. Soc.*, 1948, 38, 739-740.

- 16 BERTI L. — Sulla teoria del microscopio a contrasto di fase. *Ottica*, 1952, 6, 1-13.
- 17 BERTI L. — Teoria della microscopia in contrasti di fase. *Nuovo Cimento*, 1948, 5, 133-139. — *Ottica*, 1948, 2, 29-33.
- 18 BIOT A. — Le contrastes de phase. *Rev. Quart. Sci. Belg.*, 1952, 13, 343.
- 19 BÖSSHARD E. — Phasenkontrast Mikroskopie. *Schweiz. Brauerei Runds*, 1944, 35, 131-136.
- 20 BOUYER R. — Sur le contraste de phase. *Microscopie*, 1950, 2, 11-14.
- 21 BRATUSCHEK K. — Die lichtstärkeänderungen nach Verschieden schwingungsrichtungen in linsensystem von grossen Öffnungswinkel mit Bazierung zur mikroskopischen Abbildung. *Zeits. Wiss. Mikr.*, 1892, 9, 145-160.
- 22 BRICE E.-T., KECK P.-H. — Most favorable absorption of the Phase plate in phase contrast microscopy. *J. Opt. Soc. Am.*, 1947 37, 647-651.
- 23 BURCH. — On the phase contrast test of Zernike. *Monthly Notes of R. Ac. Sc.*, 1934, 5, 384-399.
- 24 BURCH, STOCK. — Phase contrast Microscopy. *J. Scient. Instrum.*, 1942, 19, 71-75.
- 25 BUTTERFIELD J.-V., EPSTEIN L.-I., MAGLOZZI J. — The Edge Effect in Phase microscopy. *Trans. Amer. Micro. Soc.*, 1951, 70, 363-366.
- 26 CARINI. — The Phase contrast Microscope. *Galileo Nws*, 1948, 25-33.
- 27 CONRALY A.-E. — An experimental proof of phase reversal in diffraction spectra. *J. Roy. Micro. Soc.*, 1905, 150-152.
- 28 COX A. — Phase Retarding Areas. *Nature*, 1945, 155, 425-426.
- 29 DUFOUR C. — Comportement d'un filtre interférentiel du type Fabry-Parot en tant que lame de phase. *Rev. Optiq.*, 1952 (Colloque Contraste de Phase).
- 30 EPSTEIN L.-I. — The edge effect in Phase contrast. *J. Opt. Soc. Am.*, 1950, 40, 803.
- 31 EPSTEIN L.-I. — An extension of Toraldo's Theory in phase contrast. *J. Opt. Soc. Am.*, 1949, 39, 1.053. — *J. Opt. Soc. Am.*, 1950, 40, 291-294.
- 32 EPSTEIN L.-I., HERRIOTT J.-W. — An extension of Toraldo's theory in phase contrast. *J. Opt. Soc. Am.*, 1950, 40, 576-578.
- 33 FLEURY P., MARECHAL A., M^e ANGLADE. — La théorie des Images optiques (Ch. VI). *Revue d'Optique*, Paris, 1949.
- 34 FOSTER L.-V. — Microscope Optics. *J. Opt. Soc. Am.*, 1950, 40, 275-282.
- 35 FOUCAULT L. — Description des procédés employés pour reconnaître les configurations des surfaces optiques. *C.R. Acad. Sc. XLVII*, 968.

- 36 FRANÇON M. — Image d'un petit objet rectangulaire par contraste de phase. *Rev. Opt.*, 1946, 25, 257-266.
- 37 FRANÇON M. — Le contraste de phase en optique et en microscopie. *Revue d'Optique*, Paris, 1950.
- 38 FRANÇON M. — Etude comparative du contraste et des méthodes interférentielles. *Colloque Contraste de Phase, Rev. Optiq.*, 1951.
- 39 FRANÇON M. — Limite de séparation du microscope à contraste de phase. *C.R. Acad. Sc.*, 1949, 288, 1.413-1.414.
- 40 FRANÇON M., SAEZ A. — Etude du pouvoir suparateur du microscope a contraste de phase. *Ann. Soc. Roy. Espagnole Phys. Chim., Sie A (Physique)*, 1951, XLVII, 275.
- 41 FRANÇON M., NOMARSKI G. — Les lames de phase par réflexion. *Colloque contraste de phase, Rev. Optiq.*, 1952.
- 42 FREY-WISSLING A. — Kontrasteffekt linseartiger Objekte in Phasenmikroskopie. *Naturwiss.* 1953, 40, 517.
- 43 FREY-WISSLING A. — *Naturwiss.* 1952, 39, 145.
- 44 GRABLER F. — Das Phasenkontrastverfahren u. seine anwendung in der Auflichtmikroskopie. *Mikroskopie*, 1952, 7, 43.
- 45 DE GRAMONT A. — Comment réaliser un contraste de phase. *Microscopie* (Paris), 1948, 1, M62-M64.
- 46 DE GRAMONT A. — Déphasage et contraste variables en lumière naturelle. *Bull. Micro. Appl.*, 1952, 2, 80.
- 47 GRIGGS F.-C. — Color phase contrast microscopy. *Nature*, 1950, 165, 368-369.
- 48 HASELMANN H. — Beiträge zur Phasenkontrast-mikroskopie. *Mikroskopie* (Wien), 1950, 5, 214-224.
- 49 HORI J. — On phase microscopic image theory. *J. Fac. Sci., Hokkaido* (Japan), 1951, 4, 28.
- 50 HOPKINS H.-H. — Phase structures seen in the ordinary microscope. *Colloque Contraste de Phase, Rev. Optiq.*, 1952.
- 51 JUPNIK H. — Preliminary experiments on phase difference microscopy. *J. Opt. Soc. Am.*, 1944, 34 n° 12, 773.
- 52 JUPNIK H., OSTERBERG H., PRIDE C.-E. — Phase microscopy with vertical illumination. *J. Opt. Soc. Am.*, 1946, 36, 718.
- 53 JUPNIK H., OSTERBERG H. PRIDE C.-E. — Phase microscopy with vertical illumination. *J. Opt. Soc. Am.*, 1948, 38, 338-342.
- 54 KASTLER A., MONTARNAL R. — Phase-contrast in polarized light. *Nature*, 1948, 161, 337.
- 55 KECK P.-H., BRICE A.-T. — Image contrast in Phase Microscopy. *Quart. J. Opt. Soc. Am.*, 1949, 39, 307-314.
- 56 KEMPSON D.-A., THOMAS O.-L., BAKER J.-R. — A simple Method for phase-contrast microscopy. *Quart. J. Micro. Soc.*, 1948, 39, 351-358.

- 57 KENNING F.-J. — Das Phasenkontrastverfahren und Mikroskopie. *Mikroskopie*, 1950, 5, 49-51.
- 58 KÖHLER H. LOOS. — Das Phasenkontrastverfahren u. seine Anwendung in der Mikroskopie. *Naturwiss.* 1941, 29, 49-61.
- 59 LACHENAUD M. — Le procédé à contraste de Phase de F. Zernike appliqué à la microscopie. *Rev. Optique* 1947, 26, 205-228.
- 60 LINFOOT L. — Phase-contrast microcopy. *Nature*, 1955, 156, 76.
- 61 LINFOOT. — On the Zernike phase contrast test. *Proc. Phys. Soc.*, 1946, 58, 759.
- 62 LIPPERT. — Bemerkungen zur Erläuterung des Phasen-Kontrast Mikroskope. *Optik*, 1951, 8, 543.
- 63 LOCQUIN M. BAUD. — Contraste d'amplitude, contraste de phase. *Bull. Histol. Appl.*, 1947, 41-67.
- 64 LOOS W. — Das Phasenkontrastverfahren u. seine Anwendung in Mikroskopie. *Zeiss Nachr.*, 1941, 4, 58-63.
- 65 LOOS, KLEMM W., SMEKAL A. — Anwendung der Phasenkontrastmikroskope auf Modellversuche zum Polieervorgang am Gläsern. *Naturwiss.* 1941, 29, 768-770.
- 66 LYOT B., FRANÇON M. — Observation des défauts de poli et d'homogénéité au stéréoscope par la méthode du contraste de phase. *Rev. Optiq.*, 1948, 27, 397-398.
- 67 LYOT B. — Procédé permettant d'étudier les irrégularités d'une surface optique bien polie. *C.R. Acad. Sc.*, 1946, 765-768.
- 68 MAGLOZZI J. — Phase contrast microscopy. *Educ. Focus*, 1948, 19, 6-12.
- 69 MAGLOZZI J. — Contrast effects of Phase changing elements in microscopy. *J. Opt. Soc. Am.*, 1947, 37, 982.
- 70 MANICAULT P. — Introduction à la formation des images en microscopie. *Microscopes* (Suppl. Leicaïste), n° 19.
- 71 MARTIN L.-C. — Phase contrast method in microscopy. *Nature*, 1947, 159, 827-830.
- 72 MARKS T., DIEHL F. — Die anwendung des Phasenkontrastverfahrens in der Oberflächen Mikroskope. *Naturwiss.* 1948, 35, 91-92.
- 73 NOMARSKI G. — Utilisation simultanée du contraste de phase et des interférences à ondes multiples. *Colloque Contraste de Phase, Rev. Optiq.*, 1952.
- 74 NORATH A. — Zur Erklärung des phasenkontrastverfahren. *Optik*, 1948, 3, 9.
- 75 OOSTERHUIS J.-A.-H. — Phase contrast Microscopie. *De Analyst*, 1950, 5, 151-155.
- 76 OSTERBERG H. — A method of analysing of light polarising system. *J. Opt. Soc., Am.*, 1946, 36, 364.

- 77 OSTERBERG H. — Inhomogeneous light polarising system. *J. Opt. Soc. Am.*, 1946, 36, 469-477.
- 78 OSTERBERG H. — The Theory of measuring unresolvable particles with the phase microscope. *J. Opt. Soc. Am.*, 1947, 37, 523-524.
- 79 OSTERBERG H. — Phase microscopy with critical illumination. *J. Opt. Soc. Am.*, 1948, 38, 1,099.
- 80 OSTERBERG H. — The practical theory of Phase Microscopy. *Trans. N.Y. Acad. Sci.*, 1952, 14, n° 5, 190.
- 81 OSTERBERG H. — Phase difference Microscopy as a problem of diffraction. *J. Opt. Soc. Am.*, 1954, 34 n° 12, 773.
- 82 OSTERBERG H., PRIDE G.-E. — The measurement of unresolved single particles of uniform thickness by means of variable phase microscopy. *J. Opt. Soc. Am.*, 1950, 40, 64-73.
- 83 OSTERBERG H., SCHRADER H.-S. — Microscope with special light modifiers. *U.S. Pat. N° 2.427.689* (1947).
- 84 PAYNE B.-O. — Image formation in Phase Contrast Microscopy. *J. Scient. Inst.*, 24 n° 6, 163-165.
- 85 PICT J. — Zum Phasenkontrastverfahren von Zernike. *Zeit. Instrumentenkunde*, 1938, 58, 1-12.
- 86 RAUTSCH K. — Über Einige Experimente zur Phasenkontrastmikroskopie. *Phys. Verhgd. Dtsch.*, 1954, 5, n° 4, 82.
- 87 RHEINBERG J. — On the influence on images of grating of phase difference amongst their spectra.
I *J. Roy. Micro. Soc.*, 1904, 388-390.
II » » » 1905, 152-155.
- 88 RICHARDS O.-W. — Phase contrast microscopy. *Nature*, 1944, vol. 154, N° 197, 672.
- 89 RICHARDS O.-W. — Phase microscopy. *J. bact.*, 1946, 51, 563-564.
- 90 RICHTER R. — Eine Einfache Erklärung des Phasenkontrastmikroskops. *Optik*, 1947, 2, 342-345.
- 91 RIVA I. — Présentation du microscope à contraste de phase Koriska. *Microscopie* (Paris), 1949, 1, B40-B42.
- 92 SAYLOR C.-P. — Color phase contrast microscopie : Requirements and applications. *J. Opt. Soc. Am.*, 1950, 40, 329-334.
- 93 SAYLOR C.P., BRICE A.T., ZERNIKE F. — Colorphase contrast, requirements and applications. *J. Opt. Soc. Am.*, 1949, 39, 1,053.
- 94 SCANDONE F. — Phase contrast microscopy. *Galileo Nws.*, 1948, 1, 3-13.
- 95 SCANDONE F. — Report on recent advances on Optics. *Galileo Nws*, 1948, 2, 3-23.
- 96 TAYLOR E.-W. — The controle of amplitudes in Phase contrast Microscopy. *Proc. Roy. Soc.*, 1947, 190, 422-426.

- 97 TENCHER R. — Phasenkontrast-Mikroskopie. *Orion*, 1949, 4, 229-230.
- 98 TORALDO DI FRANCIA. — Il fenomeno di Gibbs nella microscopia in contrasto di fase. *Nuovo Cimento*, 1949, 6, 30-38.
- 9 WEBER. — Das phasenkontrastverfahren nach Zernike als hilf mittel für mikroskopische Untersuchungen durch sichtiger Stoffe. *Optik*, 1948, 4, 213.
- 100 WOLTER H. — Zur abbildung zylindrischer Phasenobjekte elliptischen Querschnitt. *Ann. Physik*, 7, 147-156.
- 101 WOLTER H. — Vergleich der Verschieden verfahren zur Optischen färbung vob Phasenobjekten. *Angew. Chem. Dtsch.*, 1951, 63, 23-24.
- 102 ZERNIKE F. — Diffraction theory of the knife-edge exect and its improved form, the phase contrast method. *Physica*, 1934, 1, n° 8, 619 sq. ; *Roy. Astron. Soc.. M.N.*, 1934, 94, 377-384.
- 103 ZERNIKE F. — Das phasenkontrastverfahren bei des Mikroskopischen Beobachtung. *Ztschr. für Tech. Physik*, 1935, 2, 454 ; *Phyz. Zeit.*, 1935, 36, 848-851.
- 104 ZERNIKE F. — Phase contrast, a new method for the microscope observation of transparent specimens. *Physics*, 1942, 2, 686-698 et 974-986.
- 105 ZERNIKE F. — Observing the phase of light waves. *Science*, 1948, 107, 463.
- 106 ZERNIKE F. — A new method for the accurate measurement of phase differences. *J. Opt. Soc. Am.*, 1949, 39, 1.059.
- 107 ZERNIKE F. — A precision method for measuring small phase differences. *J. Opt. Soc. Am.*, 1950, 40, 326-328.

ADDENDA

- 107 A FRANÇON M. — Le microscope à contraste de phase et le microscope interférentiel. *Editions du C.N.R.S.* 1954.
- 107 B ZERNIKE F. — Beugungstheorie des Schneidenverfahrens und seiner Verbesertenform, der Phasenkontrastmethod. *Physica*, 1934, 1.
- 107 C FRANÇON M., NOMARSKI G. — Lame de phase à contraste variable par réflexion. *C.R. Acad. Sci.*, 1950, 230, 1.392-1.394.

MONTAGES ET APPAREILS

Voir également : 8, 14, 15, 43, 44, 54, 92, 93.

- 108 ANONYME. — Le contraste de phase en microscopie. *Microscopes* (Supplt. à Leicaïste N° 21).
- 109 ANONYME. — Bausch et Lomb phase contrast accessories. *B. and L. Optical Co.*, Rochester N.Y., 1949.

- 110 ANONYME. — Phase contrast with Bausch and Lomb accessories. *B. and L. Optical Co.*, Rochester N.Y., 1947.
- 111 ANONYME. — Beck Phase contrast apparatus. *R. and J. Beck*, London, 1949.
- 112 ANONYME. — Cooke phase contrast microscopes. *Cooke, Troughton and Simms*, York, England, 1947.
- 113 ANONYME. — Microscopia contrasto di fase. *Fratelli Koristka micro*. N° 130 (Milano).
- 114 ANONYME. — Dispositif à contraste de phase avec condenseur de Heine. *E. Leitz Wetzlar*.
- 115 ANONYME. — A.O. Spencer phase microscopes. *American Optical Co.*, Buffalo N.Y., 1948.
- 116 ANONYME. — Wild Mikroskope. *Wild Mi.* 501, 38-39 (1949) Heebregg Switz. (Notice en français ou anglais, mêmes réf.).
- 117 ANONYME. — Gebrauchsanweisung Phasenkontrast Einrichtung. *Zeiss-Winkel GmbH Göttingen*, 1949.
- 118 FRANÇON M. — Dispositif à contraste de phase pour microscope. *Rev. Optiq.*, 1950, 29, 129-134.
- 119 FRANÇON M. — Extra objective for phase contrast. *Micro. et Ent. Mon.*, 1950, 8, 43-50.
- 120 FRANÇON M., NOMARSKI G. — Dispositif à contraste de phase indépendant du microscope et utilisant une lame de phase à absorption variable. *C.R. Acad. Sci.*, 1950, 230, 1.050-1.051.
- 121 GOTTSCHIEWSKI G.-M.-M. — Über die Anwendungsmöglichkeiten der neuen Leitz Phasenkontrast-einrichtung mit Kondensor nach Heine. *Zeit. Wiss. Mikro*, 1953, 61, 185.
- 122 HARTLEY W.-G. — A variable phase-contrast system for microscopy. *Nature*, 1947, 159, 880-881.
- 123 LOCQUIN M. — Plaque de phase à absorption réglable en lumière polarisée. *Microscopie* (Paris) 1948, 1, M47-M48.
- 124 LOCQUIN M. — A propos de l'objectif dit « à réflecteur interne » de Spierer. *Microscopie* (Paris), 1948, 1, M49-M50.
- 126 LOCQUIN. — Les plaques de phase. *Mikroskopie*, 1952, 7, 59.
- 127 MALIES H.-M. — A lamp for phase contrast and other purposes. *Micro. and Ent. Mon.*, 1948, 7, 13-18.
- 128 NOMARSKI G. — Perfectionnement du dispositif à contraste de phase utilisant une lame réfléchissante. *Bull. Micro. Appl.*, 1953, 2, N° 364, 3.
- 129 NOMARSKI G. — Avantages de l'utilisation de la lame de phase linéaire. *Colloque Contraste de Phase*, 1952.
- 130 OSTERBERG H. — Polanret Microscopy. *J. Opt. Soc. Am.*, 1946, 36, 710.

- 131 OSTERBERG H. — The Polanret microscope. *J. Opt. Soc. Am.*, 1947, 37, 726-730.
- 132 OSTERBERG H., WILKINS J.-E. — The resolving power of coated objectives. *J. Opt. Soc. Am.*, 1949, 30, 553-557.
- 133 PAYNE B.-O.. — A phase contrast microscope with variable amplitude and phase. *J. Roy. Mic. Soc.*, 1950, 70, 225-231.
- 134 POWELL R.-H. — The Galileo phase contrast microscope. *J. Roy. Mic. Soc.*, 1949, 69, 237-238.
- 135 RICHARDS O.-W. — When to use special microscopes. *Biophysical Research Methods, Uber edit. Interscience Publish. N.Y.*, 1950.
- 136 TAYLOR E.-W., PAYNE B.-C. — A variable phase contrast for microscopy. *Nature*, 1947, 60, 338.
- 137 WOLTER H. — Verbesserte Phasenkontrast u. Interferenzenmessverfahren. *Phys. Verholl. Dtsch.*, 1954, 5, n° 8, 159.

ADDENDA

- 138 OETTLÉ. — Experiments with a variable amplitude-phase microscope. *J. Roy. Micro. Soc.*, 1950, 70, 232-254.
- 139 WOLTER H. — Farbige Phasenkontrastverfahren. *Naturwiss*, 1950, 37, 491.
- 139 A RICHARDS O.-W. — Image control contrast with phase microscopy. *J. Am. Opt. Soc.*, 1948, 38, 668.
- 139 B WILSKA A. — A new method for obtaining contrast in light microscopy. *Ann. Med. Exp. Biol. Fenniac*, 1952, 31, 192.
- 139 C WILSKA A. — A new method of light microscopy. *Nature*, 1953, 171, 353 et 698.
- 139 D WILSKA A. — Membrane structures in Mucus. *Experientia*, 1953, 9, 293.
- 139 E WILSKA A. — Observations with the Anoptral microscope. *Mikroskopie*, 1954, 9, (1-4), 1-79.
- 139 F WILSKA A., KOTILAINEN M. — Living nerve structure seen by new light optics. *Experientia*, 1953, 9, 295.

INDICES DE REFRACTION ET MILIEUX DE MONTAGE

- 140 ANONYME. — Refractive index and phase microscopy. *Educ. Focus*, 1949, 20, 13-15.
- 141 CLARK E.-W., MORISHITA F. — C.M.-medium, a mounting medium for small insects, mites, and other whole mounts. *Science*, 1950, 112, 789-790.

- 142 DOWNS W.-G. — Polyvinyl alcohol, a medium for mounting and clearing histological specimens. *Science*, 1943, 97, 539-540.
- 143 CROSSMON G.-C. — Mounting media for phase microscopy specimens. *Stain technol.*, 1949, 24, 241-247.
- 144 VAN DUIJN C.-Jr. — Substitues for cedarwood oil for use with immersion lenses. *Micro. and Ent. Mon.*, 1948, 7, 91-93.
- 145 FLEMING W.-D. — Synthetic mounting medium of high refractive index. *J. Roy. Micro. Soc.*, 1943, 63, 34-37.
- 146 GARNETT W.-J. — Euparal. *Micro. and Ent. Mon.*, 1945, 5, 265-266.
- 147 GRAY P., WESS G. — The use of polyvinyl alcohol and its derivatives as microscopical mounting media. *J. Roy. Micro. Soc.*, 1950, 70, 287-291.
- 148 GRECO J.-P. — Refractive indexes of currently used mounting media. *Stain Technol.*, 1950, 25, 11-12.
- 149 GROAT R.-A. — Clearing tissues with mixtures of Tributyl and tri-o-cresyl phosphates. *Stain Technol.*, 1941, 16, 111-117.
- 150 GROAT R.-A. — Preparations of copolymers of Isobutylmethacrylate and styrene for mounting media. *Stain Technol.*, 1950, 25, 87-94.
- 151 HABERMANN J. — Clearing brain tissue with anethole. *Stain Technol.*, 1948, 23, 143-144.
- 152 KERNOHAN J.-W. — A note on the use of « Cellophane » as a cover glass and a camphor-sandarac mounting medium. *Trans. Am. Micro. Soc.*, 1928, 47, 272-273.
- 153 KIRK P.-L. — Gibson C.S. Refractive index measurements in qualitative organic microanalysis. *Ind. Eng. Chem. Anal. 2nd Ed.*, 1939, 403.
- 154 KUNTZ A.-H., SPULNIK J. — Standard liquides for the microscopic determination of refractive index. *Ind. End. Chem. Anal. Ed.*, 1936, 8, 485.
- 155 LILLIE R.-D., WINDLE W.-F., ZIRKLE C. — Interim report of the Committee on Histologic mounting media : Resinous media. *Stain Technol.*, 1950, 25, 1-9.
- 156 MCCARTNEY J.-E. — A new immersion oil : Polyric. *J. Path. and Bact.*, 1944, 56, 265-266.
- 157 MONK C.-R. — An aqueous medium for mounting small objects. *Science*, 1938, 88, 174.
- 158 O'BRIEN H.-C., HANCE R.-T. — A plastic cover glass, Isobutyl-methacrylate. *Science*, 1940, 91, 412.
- 159 RICHARDS O.-W. — Contrast control in phase microscopy from appropriate choice of mounting media. *Anat. Rec.*, 1949, 105, 546.

- 160 SPENCE D.-S. — Notes on mounting. *Micro. and ent. Mon.*, 1944, 4, 266-272.
- 161 WOTTON R.-M., ZWEMER R.-L. — A note on Glychrogel mounting solutions. *Stain technol.*, 1935, 10, 21-22.

ADDENDA

Fixateurs :

- 161 A BARATI A., LEHMANN F.-E. — *Rev. Suisse Zool.*, 1951, 58, 443.
- 161 B HASELMANN H. — Analyse Mikromorphologischer Vorgänge bei der histologischen Fixation mittels phasenkontrast Mikro-Kinematographie. *Verh. Anat. Gess.*, 1951, 48, 149-152.
- 161 C HASELMANN H., HEIDENREICH F. — 3 Mitteilung : Eine methode zur mikrokinematographischen Analyse des Fixations vorganges. *Mikroskopie*, 1951, 6 (3/4), 81-83.
- 161 D PALADE G.-E. — A study of fixation for electron-microscopy. *J. Exp. Med. U.S.A.*, 1952, 95, (3), 285-297.
- 161 E PETERS V.-B., FLYNN V.-P., WARNER L. — The use of phase microscopy for the study of fixed material. *Anat. Rec.*, 1950, 106, 311.
- 161 F POLICARD, BESSIS M., BRICKA M. — *Bull. soc. Micr. Appl.*, 1952, 2 (2), 29.

METHODES D'UTILISATION

- 162 APPELT H. — Einnhrung in die mikroskopischen Untersuchungs-methoden. *Akad. Verl. Athen. Edr. Postdam*, 1950.
- 163 BACHRACH M. — Some applications of phase-contrast microscopy. *Quart. J. Micro. Sci.*, 1946, 88, 491-500.
- 164 BAKER J.-R., KEMPSON D.-A., BRUNET P.-C.-J. — A simple method for phase contrast microscopy : Improvements and techniques. *Quart. J. Micro. Sci.*, 1949, 90, 323-329.
- 165 BARER R. — Some applications of phase contrast microscopy. *Quart. J. Micro. Sci.*, 88, n° 4, 491.
- 166 BENNETT A.-H. — Phase microscope, its developments and utility. *Sci. Month.*, 1946, 63, 191-193.
- 167 CROSSMON G.-C. — Dispersion staining with phase contrast microscope accessories. The microscopie identification of quartz. *Science*, 1949, 110, 237-238.
- 168 FEISSLY R., QUEBATTE R. — L'examen microscopique par les contrastes de phase. *Rev. Hematol.*, 1947, 2, 411-424.

- 169 GANZ E. — Das Phasenkontrastverfahren nach Zernike zur Untersuchung ungefärbter mikroskopischer präparate. 124te Jahresversammlung S.N.G. (Botanik), 1944.
- 170 LILLIE R.-D. — Histopathologic techniques. *Blakinson Ed.*, Philadelphia, 1948.
- 171 LOCQUIN M., MESSIS M. — Amélioration des images observées avec la technique de l'ombrage par examen au contraste de phase. *C.R. Soc. Biol.*, 1948, 142, 1.497-1.498.
- 172 LOOS W. — Das Phasenkontrastverfahren nach Zernike als Biologisches Forschungsmethod. *Klin. Wchschr.*, 1941, 20, 849-853.
- 173 PETRUNKEVITCH A. — On differential satining. *Anat. Rec.*, 1937, 68, 267-280.
- 174 RICHARDS O.-W. — Biological phase microscopy. Cold Springs Harbor Symp. Quant. Biol., 1947, 11, 208.
- 175 RICHARDS O.-W. — Applications of phase microscopy in electron microscopy. *J. Appl. Phys.*, 1947, 18, 1947.
- 176 RICHARDS O.-W. — The effective use and proper care of the microscope. *Am. Opt. Co. Ed.*, Buffalo N.Y., 1949.
- 177 SALMON M.-V. — Practical phase contrast microscopy. *Micro and Entom. Mon.*, 1947, 6, 177-188.
- 178 SCHMITT U. — Über Objekttrere von Phasenkontrastbildern handelsüblicher Phasenkontrastmikroskope. *Phys. Verhdlg. Dtsch.*, 1954, 5, n° 3, 53.
- 179 TAYLOR E.-W. — The practical application of phase contrast to the Biologist's microscope. *J. Roy. Micro. Soc.*, 1946, 65, 1-8.
- 180 WOLTER H. — Zur Deutung von Beobachtung mit dem Phasenkontrastverfahren. *Natuwiss.*, 1950, 37, n° 12, 272-276.

MICROPHOTOGRAPHIE

- 181 ANONYME. — Photomicrography. *Eastman Kodak Co.*, Rochester N.Y., 14th ed.
- 182 BALLERINI L., SCANDONE F. — Microcinématographie en contraste de phase. *Microscopie* (Paris), 1, M.162-M.164.
- 183 DRAGESCO J. — La technique microcinématographique sur films étroits. *Microscopie* (Paris), 1948, 1, M.10-M.40.
- 184 FREDERIC J. — La microcinématographie, technique de recherches cytologiques. *Sem. Méd.*, 1953, N° 29 (spécial).
- 185 HEARD O.-O. — Some practical considerations on time lapse motion in photomicrographic devices. *J. Biol. Photo Ass.*, 1932, 1, 4-19.

- 186 HUGHES A.-F.-W. — The technique of ciné-photomicrography of living cells. *J. Roy. Micro. Soc.*, 1949, 69, 121-131.
- 187 LAPORTE M. — The application of white light flash tubes to instantaneous photomicrography in ordinary or phase contrast microscopy. *C.R. Acad. Sci.*, Paris, 1950, 230, 1.592-1.593.
- 188 MAURER J.-A. — Exposure control in photomicrography. *J. Bio. Photo Ass.*, 1944, 12, 173-185.
- 189 MICHEL K. — Mikrophotographie : das phasenkontrastverfahren. *Hdb. Wiss. Angw. Photo.* Wien, 1943, 1, 546-555.
- 190 PIZON P. — Photomacrophographie et photomicrographie. *Revue d'optique Ed.*, Paris, 1949.
- 192 RALPH P.-H. — Phase microscopy photographs of cells of blood and blood forming organs. *Anat. Rec.*, 1949, 103, 583.
- 193 RICHARDS O.-W. — Phase photomicrography. *J. Biol. Photo. Ass.*, 1947, 16, 29-38.
- 194 SHILLABER C.-P. — Photomicrography in theory and practice. *John Wiley and sons Edr.* N.Y.
- 194 A COLE W.-V. — The demonstration of cellular elements by the use of filters in photomicroscopy. *J. Biol. Photo. Ass.*, 1949, 17, 115-120.
- 194 B CARPENDALE T.-F., BALDERS J. — Improved method of photomicrography by use of the Electronic flash. *J. Lab. Clin. Med.*, 1954, 44, 754.
- 194 C PIJPER A. — On Cinemicrography. *Univ. Film J.*, 1954, 6, 6.

HISTOLOGIE

VOIR EGALEMENT CYTOLOGIE ET METHODES D'UTILISATION

- 195 ALBERTINI A. (von). — Zur anwendung der Phasenkontrastmikroskopie in der pathologischen Histologie. *Schw. Z. Path. u. Bakt.*, 1945, 8, 298-310.
- 196 ALBERTINI A. (von). — Pflasterepithelzellen im Phasenkontrastbild. *Acta Anat.*, 1946, 1, 463-46.
- 197 ALBERTINI A. (von). — Erfahrung und Ergebnisse mit dem Phasenkontrastverfahren in der normalen und pathologischen Histologie. *Prax. Schweiz. Rund. Mediz.*, 1946, 35, 107-112.
- 198 ALBERTINI A. (von). — La méthode du contraste de phase en histologie. *Rev. Hematol.*, 1948, 3, 139-153.
- 199 ALBERTINI A. (von). — Vergleichende Histologische Gewulstuntersuchungen mit dem Phasenkontrastverfahren. *Schweiz. Ztsch. Path. Bakt.*, 1947, VII (1), 4-29.
- 200 ALBERTINI A. (von)., AUFDERMAUR M. — Zell- u. Strukturstudien am embryonalen Bundgewebe. *Schweiz. Ztsch. Path. u. Bakt.*, 1947, 10, 1-11.

- 201 ANTONIO A. — Quantitative researches on the optical properties of human bone. *Nature* (London), 1949, 163, 604.
- 202 AUSTIN C.-R., SMILES J. — Phase-contrast microscopy in the study of fertilization and early development of the rat egg. *J. Roy. Micro. Soc.*, 1948, 68, 13-19.
- 203 BARER R. — Phase contrast microscopy in Anatomy. *J. Anat.* (London), 1949, 83, 61.
- 204 BENSLEY S.-H. — Histological studies of the reactions of cells and intercellular substances of loose connective tissues to the spreading factor of testicular extracts. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 1950, 52, 983-988.
- 205 BODINGBAUER J. — Über die Leistungen des phasenkontrastmikroskopes in der Zahnhistologie. *Mikroskopie*, 1951, 6 (3 et 4), 114-118.
- 206 BRODSKY. — (en russe) (Microscopie en contraste de phase, ses possibilités et ses applications en histologie normale et pathologique). *Usp. Sovrem. Biol. SSSR*, 1952, 33 (2), 305-316.
- 207 BRUNI A. — La sostanza griglia dei centri nervosi studiata col microscopio a contrasti di fase. *Biol. Latina*, 1949, 1, 688-696.
- 208 CHÉVREMONT M., FIRKET H. — *Nature*, 1951, 167, 772.
- 209 COLE W.-V. — The use of phase contrast in the analysis of the osteopathic lesions. *J. Osteopath.*, 1948, 55 (10), 14-17.
- 210 FRAUCHIGER E. — Phasenmikroskopische Untersuchungen am Plexus Choroïdeus. *Schweiz. Arch. Neuer Psychiat.*, 1946, 58.
- 211 GATENBY J.-D., TOHAMY A.-A., MOUSSA M. — The sympathetic ganglioncell with Sudanblack and the Zernike Microscope. *J. Roy. Micro. Soc.* (transactions). Dec. 1950, 342 sq.
- 212 GATENBY J.-D., MOUSSA M. — The dorsal root ganglion of the Kitten with sudan dyes and the Zernike Microscope. *J. Roy. Micro. Soc.*, 1949, 69, 185-199.
- 213 GLATTHAAR E. — Über versuche zur cytologischen differencierung des atypisehen portioepithels mit Hilfe von Gewebezuchtung u. phasenkontrast mikroskopie. *Schweiz. Med. Wschr.*, 1948, 78 (29), 720.
- 214 GREEN J.-D. — Innervation of the pars distalis of the adenohypophysis studied by phase-microscopy. *Anat. Rec.*, 1951, 109, 99-107.
- 215 HAAR H., WERIEZ W. — Untersuchungen am peripherien sympathischen nervengewebe mit Hilfe des Phasenkontrastverfahrens. *Acta Neurovegetat.*, 1950, 1 (1-2), 87-105.
- 216 HAAR H., WERITZ W. — Die Leistungsfähigkeit des Phasenkontrastverfahrens bei der darstellung vegetativer ganglienzellen des sumpatischen Grenzstranges u. des Auerbachschen Plexus des Appendix. *Brun's Beitr. Z. Klin. Chir.*, 1950, 181 (52), 229-232.

- 217 HARTROFT W. — The Islets of Langerhans in man visualised by phase microscopy. *J. Clin. Endocr.*, 1950, 10, 828.
- 218 HAZELMANN H. — Mikroskopie histologischer Objekte und das Phasenkontrastverfahren. *Klin. Wschr.*, 1948, 26, 124.
- 219 HIRSCH (von). — Phasenkontrastmikroskopie histologischer Schnitte. *Z. Wiss. Mikro.*, 1953, 61, 337.
- 220 HOESSLY G.-H. — Untersuchung am Zentralnervensystem mit dem Phasenkontrastmikroskopieverfahren. *Acta Anat.*, 1947, 3, 271-294.
- 221 KLUDAS M., MAIBAUER D. — Phasenkontrastmikroskopischen Beobachtungen an Histologischen Schnitten. *Berliner Med. Ztsch.*, 1951, 2 (5-6), 119-122.
- 222 POLICARD A., COLLET A. — Utilisation de la microscopie en contraste de phase dans l'étude de la pathogénie des pneumoconioses. *Sem. Méd.*, 1953, spec. n° 16.
- 223 ROSSI F., PESCIOTTO G. — Studi ultramicroscopici ed in contrasto di fase degli spodogrammi placentari. *Accad. Med.*, Torino, 1950, 65, 110-112.
- 224 SCHWARZ W., SCHLUCHHARDT E. — Die Struktur des frischen Glaskörpers (Untersuchungen im Phasenkontrast-, Dunkel- u. Immersions Ultramikroskop). *Z. Zellforsch.*, 1950, 35 (3/4), 293-310.
- 225 SIERING H. — Das Phasenkontrastverfahren in der pathologischen Histologie. *Pathol. Zell.*, 1949.
- 226 VOIGT G.-E. — Das Phasenkontrastverfahren zur Untersuchung menschlicher Haare. *Pathologie*, 1949, 85 (10/11), 370 (Zentralblatt).
- 227 VOIGT G.-E., WITTIG H.-H. — Phasenkontrastmikroskopie u. Einflussmittel histologischer Präparate. *Zentbl. Pathol.*, 1951, 87, 173-180.

CYTOLOGIE ET CYTOPATHOLOGIE

VOIR EGALEMENT HISTOLOGIE ET METHODES D'UTILISATION
et 172.

- 228 ALBERTINI (von) A. — Cytologische Exsudatbefunde mit dem Phasenkontrastbefunde. *Schweiz. Ztschr. Path. Bakt.*, 1946, 11 (6), 701.
- 229 BAKER J.-R. — Further Remarks on the Golgi Element. *Quat. J. Micro. Sci.*, 1949, 90, 293-307.
- 230 BAUD C.-A. — Structure microscopique et inframicroscopique de la membrane des cellules épithéliales pavimenteuses. *C.R. Acad. Sci.*, Paris, 1947, 225, 590-592.
- 231 BEJDL W. — Beobachtungen an Plattenepithellzellen im Phasenkontrastmikroskop u. mit anderen Methoden. *Mikroskopie* (Wien), 1949, 4, 28-40.

- 232 BRICE A.-T., JONES R.-P., SMYTH J.-D. — Golgi apparatus by phase-contrast microscopy. *Nature*, 1946, 157, 553-554.
- 233 BUCHSBAUM R. — Individual cells observed under phase-microscopy during fixation. *Anat. Rec.*, 1947, 99, 640.
- 234 BUCHSBAUM R. — Individual cells observed under phase microscopy, before and after fixation. *Anat. Rec.*, 1948, 102, 19.
- 235 CORTI A. — Il lacunoma osservato col'microscopio a contrasto di fase. *Atti Acad. Lincei (Roma)*, *Rend. Cl. Sci. Ser.*, 1948, 8A, 4, 132-135.
- 236 CULINER A., GLUCKMANN. — The use of the Phase-contrast microscope in clinical gynaecology, preliminary report. *J. Obst. Brit. Emp.*, 1948, 55 (3), 261-267.
- 237 FARRIS E.-J. — A new method of semen analysis. *Anat. Rec.*, 1947, 97, 113.
- 238 FARRIS E.-J. — Motile spermatozoa and index of fertility in man. *Anat. Rec.*, 1948, 100, 148 ; *Anat. Rec.*, 1948, 101, 700 et 780-781.
- 239 FARRIS E.-J. — A technic of counting motile spermatozoa. *Anat. Rec.*, 1941, 101, 679.
- 240 FAWCETT D.-W., VALLÉE B.-M., SOULE M.-H. — A method for concentration and segregation of malignant cells from bloody, pleural and peritonea fluids. *Science*, 1950, 111, 34-36.
- 241 FIROR W.-M., GEY G.-O. — A study of malignant cells with phase difference microscopy. *Ann. Surg.*, 1947, 125, 604.
- 242 FOSSEL M. — Spermauntersuchungen und phasenkontrastverfahren. *Mikroskopie*, 1951, 6 (7-8), 260-261.
- 243 FRÉDÉRIC J., ROBINEAUX R. — Etude par la microcinématographie à l'accélééré et en contraste de phase de la fonction phagocytaire. *Sem. Méd.*, 1953, spéc, n° 25.
- 244 FRITZE E., STRUFE H.-O. — Die Bedeutung der Phasenkontrastmikroskopie in der Klinischendiagnostik. *Dtsch. Med. Wschr.*, 1951, 76 (35), 1.076-1.078.
- 245 GLATTHAAR E. — L'emploi de la culture de tissus et de la microscopie en différence de phase pour le jugement pronostiqué des lésions précancéreuses du col utérin. *Bruxelles Méd.* 24-7-49, n° 30.
- 246 HASELMANN H. — Strukturprobleme der Phasenkontrastmikroskopie. *Anat. Nachr.*, 1950, 1, 86.
- 247 HASELMANN H. — Protoplasmastrukturen und der Phasenkontrastmikroskopie. *Klin. Wschr.*, 1948, 26, 701.
- 248 HENNING N., WITTE S. — Über eine neue methode zur cytodagnostik der Magenkrankheiten. *Dtsch. Med. Wschr.*, 1952, 1 (1).
- 249 HOFFMANN G.-T., ROTTINO A. — Phase microscopy in study of Hodgkin's disease in lymph nodes in relation to histogenesis of Sternberg-Reed cells. *Blood*, 1950, 5, 74-78.

- 250 HUGHES A.-F.-W., SWANN M.-M. — Anaphase movements on the living cells. A study with phase contrast and polarised light and chick Tissue cultures. *J. Exper., Biol.*, 1948, 25, 45-70.
- 251 JONES O.-P. — Mitochondria and their relation to the so-called hyaloplasm. *J. Lab. Clin. Med.*, 1947, 32, 700-719.
- 252 JONES O.-P. — The Golgi element in primitive erythroblasts of the 11-days rat embryo. *Anat. Rec.*, 1947, 97, 347.
- 253 JONES O.-P. — A study of mitochondria in dry smears of embryonic blood. *Anat. Rec.*, 1947, 97, 393.
- 254 JONES O.-P. — Mitochondrial influence on nuclear pattern of lymphoid cells. *Anat. Rec.*, 1948, 100, 49.
- 255 JONES O.-P. — Nuclear structures versus nuclear pattern. *Blood*, 1948, 31, 967-986.
- 256 JONES O.-P., RICHARDS O.-W. — A method for studying dry smears of blood with phase microscopy followed by stain techniques. *Anat. Rec.*, 1947, 97, 417-418.
- 257 KAUFMANN B.-O., McDUFFEE R.-C. — Chromosome structure as revealed by tryptic digestion. *Anat. Rec.*, 1949, 105, 495-496.
- 258 LETTREE H. — Darstellung der Zellspined in Fibroblasten. *Naturwiss*, 1951, 38, 119.
- 259 LEWIS S.-R., POMMERAT C.-M., EZELL D. — Human epidermal cells observed in tissue culture with phase contrast microscopy. *Anat. Rec.*, 1949, 104 (4), 487-504.
- 260 LUDFORD J.-R., SMILES J., WELCH F.-V. — The study of malignant cells by phase contrast and ultraviolet microscopy. *J. Roy. Micro. Soc.*, 1948, 68, 1-9.
- 261 LUDFORD J.-R., SMILES J., WELCH F.-V. — Cytological characteristics of fibroblast sarcoma cells demonstrable by phase contrast microscopy. *J. Roy. Micro. Soc.*, Sie III, 1950, 70 (2), 186-194.
- 262 LUDIN H. — Tumorzellnachweis in Organpunktaten mit dem Phasenkontrastverfahren ? *Schweiz. Med. Wschr.*, 1948, 710.
- 263 LUDIN H. — Über die Bedeutung der Lymphknotenponktion für die Diagnose der Lymphogranulomatose. *Radiol. Clin.*, 1947, 16, 212-220.
- 264 MERKLEN F.-P., COTTENOT F. — Le microscope à contraste de phase en dermato-vénérologie. *Soc. Fse. Der. Syphil.*, 6-6-1950.
- 265 MICHEL K. — Die Darstellung von Chromosomen mittels des Phasenkontrastverfahrens. *Naturwiss*, 1941, 29, 61-62.
- 266 MICHEL K. — Das Phasenkontrastverfahren u. seine Eignung für cytologische Untersuchungen. *Naturwiss*, 1950, 37, 52-57.
- 267 MOESCHLIN S., PELEAR J.-R., HUGENTOBBER F. — Untersuchungen über Phasenkontrastveränderung der Plasmazellen bei der experimentelle Antikörperbildung. *Schweiz. Med. Wschr.*, 1951, 50.

- 268 OETTLÉ A.-G. — Golgi apparatus of living human testicular cells seen with phase contrast microscopy.
- 269 OETTLÉ A.-G. — « Optical membranes », a common artefact. *J. Roy. Micro. Soc.*, 1950, 70, 255-265.
- 270 ORSTEIN L., POLLISTER A.-W. — Applications of Phase contrast microscope in cytology and electron-micrography. *Trans. N.Y. Acad. Sci.*, 1952, 14 (5), 194-209.
- 271 PAFF G.-H., BLOOM F., REILLY C. — The morphology and behavior of neoplastic mast-cells cultivated in vitro. *J. Exper. Med.*, 1947, 86, 117-124.
- 272 PFEIFFER H.-H. — New experiments on fundamental structures in cytoplasmic systems. *Publ. Stazione Zool.*, Napoli, 1951, 23 (supp.), 147 sq.
- 273 POLLISTER A.-W., LUSTENBERGER C. — The nature of specificity of methylgreen for chromatin. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 1949, 35, 111-116.
- 274 RALPH P.-H. — Observations on the surface of epithelial cells. *Anat. Rec.*, 1947, 98, 221.
- 275 REITTER R. — Vergleichende cytohistologische Untersuchungen an bösartigen Tumoren unter besonderer Berücksichtigung des phasenkontrastbild. *Archiv. Klin. Chir.*, 269 (3).
- 276 RICHARDS O.-W. — Phase difference microscopy for living unstained protoplasm. *Anat. Rec.*, 1944, 89, 548.
- 277 RICHARDS O.-W. — Phase contrast microscopy for tissue culture : in « *Method in medical research* » Visscher, Chicago, Ed. 1951.
- 278 ROTH O.-A. — Die Cyclusdiagnose aus dem ungefärbter Vaginalsekret mit hilfe des Phasenkontrastmikroskops. *Dtsch. Med. Wschr.*, 1952, 1 (1).
- 279 ROTH O.-A. — Über die Möglichkeit einer histologischer Schnell-diagnose des Uteruskarzinoms mit Hilfe der Phasenkontrastmikroskopie. *Zbl. Gynäk.*, 1951, 73 (13), 1.138-1.142.
- 280 RUNGE H., VOGÉ A., HASELMANN H. — Untersuchungen des Vaginal-seears mittels Phasenkontrastmikroskopie. *Geb. Frauenhllk.*, 1949, 9, 627-639.
- 281 RUNGE H. — Neue Methode zur Früherkennung des Uteruskarzinoms unter besonderer Berücksichtigung der Phasenkontrastmikroskopie. *Neue Med. Welt*, 1950, 1, 29-30.
- 282 SCHONENBERG H. — Über das Liquorzellbild bei der idiopathischen mononuklearen Meningitis. *Ztschr. Kinderhllk.*, 1951, 69, 274-284.
- 283 SYLVÉN B. — The cytoplasm of living tissue mast-cells in visual phase contrast. *Exp. Cell. Res. U.S.A.*, 1950, 1 (3), 492-493.
- 284 TALIMISIAN T.-N., ADAMSON D.-M. — A phase contrast microscopy study of Xray induced pycnosis in the living cell. *Anat. Rec.*, 1950, 108, 84.

- 285 WIED G.-L. — Differentialdiagnostische Betrachtung über den cytologischen Vaginalabstrich. *Dtsch. Gesundhtw.*, 1950, 5 (46), 1.444-1.450.
- 286 WIED G.-L. — Über die cytologische Karzinomdiagnostik aus dem Urinsediment. *Arztl. Wschr.*, 1951, 6 (4), 80-85.
- 287 WUNDRIK G. — Cytologische Untersuchungen und Phasenkontrastverfahren. *Studien Institut Natur- u. Geisteswiss. Anthropologie*, Berlin, 30-8-1952, pp. 42-50.
- 288 ZINGG W. — Über experimentelle Rohrzuckerspeicherung in der Mitochondrien der Nierentubuli. *Diss. Zürich*, 1950 ; *Schweiz. Ztschr. Allg. Path. Bakt.*, 1951, 16 (1), 1-16.
- 289 ZINSER H.-K. — Zytologische Karzinomdiagnose mit dem Phasenkontrastverfahren. *Zblatt. Gynäk.*, 1949, 71 (10), 945-955.
- 290 ZINSER H.-K. — Die Vitalcytologische Karzinomdiagnose : Untersuchungen zur methode nach Papanicolaou mit dem Phasenkontrastverfahren. *Z. Gebustsh. Gynäk*, 1950, 133 (1), 74-106.
- 291 ZOLLINGER H.-U. — Phasenmikroskopische Beobachtung an Zellkulturen. *Mikroskopie* (Wien), 1948, 3 1-11.
- 292 ZOLLINGER H.-U. — Cytologic studies with the phase microscope. *Am. J. Path.*, 1948, 24, 545-567, 568-569, 797-811 et 1.039-1.053.
- 293 ZOLLINGER H.-U. — Phasenmikroskopische Beobachtungen über Zelltod. *Schweiz. Ztschr. Path. Bak.*, 1948, 11, 276-282.
- 294 ZOLLINGER H.-U. — Experimenteller Beitrag zur Frage der Mitochondrienfunktion. *Experienta*, 1948, 4 (7), 312-314.
- 295 ZOLLINGER H.-U. — Trube Schwellungen und Mitochondrien. *Schweiz. Ztschr. Bakt*, 1948, 11 (6), 618-634.
- 296 ZOLLINGER H.-U. — Über hyalin-tropfige Veränderungen der Nierenhauptstücke als Ausdruck von Eiweiss-speicherung. Phasenkontrastmikroskopische Beobachtungen über Mitochondrienfunktionen. *Schweiz. Ztschr. Allg. Path. Bakt.*, 1950, 13 (2), pp. 146-163.
- 297 ZOLLINGER H.-U. — Zum Quantitativen Nukleoproteingehalt und zur morphologie der Mitochondrien. *Experientia*, 1950, 6 (2), 14.
- 298 ZOLLINGER H.-U. — Les mitochondries, leur étude à l'aide du microscope à contraste de phase. *Rev. Hématol.*, 1950, 5, 5-6.
- 299 ZOLLINGER H.-U. — Zur Technik der intravitalen Phasenmikroskopie. *Experienta*, 1952, 8, 78.

HEMATOLOGIE

VOIR EGALEMENT CYTOLOGIE ET PARTICULIEREMENT : 243, 249, 252, 256, 263

- 300 BESSIS M., BRICKA M. — Etude sur l'étalement des leucocytes du sang humain au microscope à contraste de phase et par la méthode de l'ombrage. *Rev. Hématol.*, 1949, 4, 350-363.

- 301 BESSIS M. — Etude sur les cellules des leucémies et des myélomes au microscope à contraste de phase et par la méthode de l'ombrage. *Rev. Hématol.*, 1949, 4, 364-394.
- 302 BRECHER. — The Study of unstained reticulocytes. *Proc. Soc. Exper. Biol. Med.*, 1948, 69, 89-90.
- 303 BRECHER. — Phase microscopy in the study of reticulocytes. *Bull. Internat. Ass. Med. Museums*, 1949, 30, 99-105.
- 304 CAZAL P., IZARN P. — Intérêt de la microscopie en contraste de phase pour la numération des plaquettes et des réticulocytes. *Montpellier Méd.*, 1950, 5 (37-48), 382 sq.
- 305 CROSSMON G.-C. — The counting of blood cells with phase contrast microscopy. *Am. J. Clin. Path.*, 1950, 20, 1.041-1.043.
- 306 DAUSSET J., SCHWARTZMANN V. — Influence of age and sex upon frequencies and cytologic types of human leukemias. Evidence of a Myeloid-lymphoid antagonism. *Blood (U.S.A.)*, 1951, 6 (11), 976-989.
- 307 DICKIE A.-M., HEMPELMANN L.-H. — Morphologic changes in the lymphocytes of persons exposed to ionising radiations. *J. Lab. Clin. Med.*, 1947, 32, 1.045-1.059.
- 308 DISCOMBE G. — Application des méthodes cytologiques modernes aux travaux de laboratoire clinique. *Rev. Hématol.*, 1950, 5 (5-6), 565-579.
- 309 DISCOMBE G. — Phase microscopy in a clinical laboratory. *Acta Haematol.*, 1950, 3, 151 sq.
- 310 FEISSLY R. — On platelet counting with the Phase microscope. *Acta Helvet. Sci.*, 4 sept. 1948.
- 311 FEISSLY R., LUDIN R. — Microscopie par contraste de phase, applications à l'hématologie. *Rev. Hématol.*, 1949, 4 (3), 481-501.
- 312 LIND M.-E., ASHLEY O. — Limitations of the Blood smear technique for the detection of malignancy. *Lab. Digest*, 1950, 13, 6-9.
- 314 MOESCHLIN S. — Phasenkontrastuntersuchungen in der Hämatologie. *Acta Haematol.*, 1949, 2 (6), 399-426.
- 315 RALPH P.-H., DOAN C.-A. — Observations on normal adult human Leucocytes. *Anat. Rec.*, 1948, 100, 705.
- 316 RALPH P.-H. — The Human Platelet. *Anat. Rec.*, 1950, 106, 234.
- 317 SABIN F.-R. — Studies of living human blood cells. *Bull. John Hopkins Hosp.*, 1923, 34-35, 277.
- 318 SCHONENBERG H. — Phasenkontrastmikroskopische Untersuchungen in der Hämatologie. *Monatsschr. Kinderh. Dtsch.*, 1951, 99 (11), 421 sq.
- 319 TISCHENDORF W. — Cytodiagnostik des Lymphknotenpunktates. *Erg. Inn. Med. Kinderheilk*, 1951, 2, 183.

- 320 WATTS W.-E. — Studies on lymphocytes of persons treated with radioactive iodine. *J. Lab. Clin. Med.*, 1950, 35, 885-889.

ADDENDA

- 320 A BOMMER W. — Phasenkontrastmikroskop in medizinerforschung u. Diagnostik. *Klin. Wschr. Dtsch.*, 1952, 30 (25-26), 577-583.
- 320 B FREDERIKSE A.-M. — Der Brechungsindex des Protoplasmas. *Protoplasma*, 1933, 19, 473-483.
- 320 C ZINSER H.-K. — Klinisch-mikroskopische Studien mit dem Phasenkontrastverfahrens. *Jenaer Zeiss. Jahrb.*, 1950, 145-151.
- 320 D BESSIS M., LOCQUIN M. — Microscopie en contraste de phase appliqué à la cytologie. Examen comparé des techniques et des dispositifs. Colloque « Contraste de phase ». *Rev. Optiq.*, 1952, 238-258.

BACTERIOLOGIE et VIROLOGIE

- 321 ANGULO J.-J. — The Inclusion bodies from diseases of indetermined etiology and from apparently healthy animals as seen unstained with the phase-microscope. *J. Infect. Dis.*, 1949, 85, 243-250.
- 322 ANGULO J.-J. — Demonstration of viral inclusion bodies in unstained tissue sections with the aid of the phase-microscope. *Arch. Ges. Virusforschung*, 1949, 4, 118-129.
- 323 ANGULO J.-J., RICHARDS O.-W., ROQUE A.-L. — Demonstrations of viral inclusion bodies in unstained tissue sections with the aid of the Phase microscope : Inclusion bodies of yellow fever, fowl pox and distemper. *J. Bact.*, 1949, 57, 297-303.
- 324 BARER R. — Phase contrast microscopy of viruses. *Nature*, 1948, 162, 251.
- 325 BOMMER W. — Untersuchungen über Ursprung u. Bedeutung der sogenannten « grossen Körper » bei vergrünenden streptokokken. *Diss. Marburg*, 1950.
organisms as revealed by phase contrast illumination. *J. Path.*,
organisme as revealed by phase contrast illumination. *J. Path.*,
1949, 61, 127-131.
- 327 BOYD J.-S.K. — Development of bacteriophage in E. Coli B. *Nature*, 1949, 164, 874-875.
- 328 DELAMATER E.-D. — A study of the life-cycle of spirochetes and other microorganisms by means of phase contrast microscope and routine microscope. *Trans N.Y. Acad. Sci.*, 1952, 14 (5), 199-201.
- 329 DELAMATER E.-D., NEWCOMER V.-D., HAANES M., WIGGALL R.-H. — Study on the life cycle of spirochetes : The use of phase contrast microscopy. *Am. J. Syph. Gon. Ven. Dis.*, 1950, 34, 122-125.

- 330 DYAR M.-T. — Isolation and histological study of free-living spirochetes. *J. Bact.*, 1947, 54, 483-493.
- 331 EISENSTARK A.-R., McMAHON K.-J. — A cytological study of a plémorphic strain of *Azotobacter Agile* with the Electron and Phase microscope, and the Robinow staining technique. *J. Bact.*, 1950, 59, 75-81.
- 332 EISENSTARK A.-R., McMAHON K.-J. — Some phase microscope observations of *Azotobacter Agile*. *Soil Sci.*, 1949, 68, 329-331.
- 333 HANSEN H.-G. — Zum Erregernachweis der Toxoplasmose in vivo. *Die Med.*, 1952, 5, 148-150.
- 334 HASELMANN H., KAPPEL W. — Über die untersuchung lebender Gonokokken mit dem phasenkontrastverfahren. *Arch. Dermat.*, 1949, 187, 501-505.
- 335 HOFER A.-W. — Bacteriophage under the ordinary microscope. *J. Bact.*, 1947, 53, 781-792.
- 336 HOFER A.-W., RICHARDS O.-W. — Observation of bacteriophage trough the light microscope. *Sci.*, 1945, 101, 466-468.
- 337 HOFFMEISTER W. — Die Torulopsis Neoformans Infektion. *Klin. Wchschr.*, 1951, 29, 301-307.
- 338 HUNGATE R.-E. — The Anaérobic mesophilic cellulolytic Bacteria. *Bac. Rev.*, 1950, 14 (1), 1-49.
- 339 KLUDAS M., SCHMAGER A. — Ist eine reinmorphologische Diphterie-diagnose mit dem Phasenkontrastmikroskop möglich ? *Z. Hygiene*, 1951, 132, 360-367.
- 340 KNOLL H. — Zur anwendung der Phasenkontrast-mikroskopie in der Bakteriologie. *Zeiss Nachr.*, 1944, 5, 38-53.
- 341 LELONG M., DESMONTS G. — L'emploi du microscope à contraste de phase dans la réaction de Sabin-Feldmann. *C.R. soc. Biol.*, 1951, 145, 1.160-1.161.
- 342 LOFGREN R. — The structure of *Leishmania Tropica* as revealed by Phase and Electron microscopy. *J. Bact.*, 1950, 60, 617-625.
- 343 MEYER F.-K., HOSSLY G.-F., LAROON A. — Mechanism of immunity in plague infections. *Science*, 1948, 108, 681.
- 344 MEYER-PIETSCHMANN K. — Lebendbeobachtungen an *Myococcus Rubescens*. *Arch. f. Mikrobiol.*, 1951, 16, 163-176.
- 345 MULLER E. — Über die Entwicklung von *Pleospora Glaeumanni*. *Bern. Schweiz. Bot. Ges.*, 1951, 61, 165-174.
- 346 PERREY W.-L.-M. — Cultivation of *Treponema Pallida* in tissue culture. *J. Path. Bact.*, 1948, 60, 339-342.
- 347 PIJPER A. — The flagella of *Spirillum volutans*. *J. Bact.*, 1949, 57, 111-118.
- 348 POETSCHKE G., LEWANDOWSKI M. — Der Nachwiss vom *Mycobacterium Tuberculosis* mit dem Phasenkontrastmikroskopie. *Klin. Wchrschr.*, 1953, 31, 879.

- 349 POETSCHKE G., BOMMER W. — Phasenkontrastmikroskopische Lebendbeobachtung zur Morphologie der Streptokokken. *Zbl. Bakt. Parasitenkd. Infekt. Hyg.*, 1950, 155, 140-152.
- 350 POETSCHKE G., BOMMER W. — Die technik der Lebendbeobachtungen von Bakterien im Phasenkontrastmikroskop. *Zbl. Bakt. Parasitenkd. Infekt. Hyg.*, 1950, 156, 127-135.
- 351 POETSCHKE G., KAISER B. — Der Nachweis von Treponema Pallida mit dem Phasenkontrastmikroskop. *Der Hautarzt*, 1951, 2 (9), 408-410.
- 352 PORTER J.-R. — Bacterial Chemistry and physiology. *John Wiley and sons Ed.* N.Y.
- 353 PREUNER R. — Untersuchungen über die Bakterienkern. *Arch. Hyg. Bakt.*, 1951, 134 (4), 281-294.
- 354 RICHARDS O.-W. — The size of living bacteria measured with the phase microscope. *J. Bact.*, 1946, 51, 585.
- 355 RICHARDS O.-W. — Growth of bacterial and fungal colonies as seen with the phase microscope. *J. Bact.*, 1947, 54, 4.
- 356 RICHARDS O.-W. — Phase microscopy in Bacteriology. *Stain. Technol.*, 1948, 23, 55-64 ; *J. Roy. Micro. Soc.*, 1949, Sie III, 69 (1), 32.
- 357 RICHARDS O.-W., WADE H.-W. — Applications of the Phase Microscopy to the examinations of the Leprosy bacillus. *Int. J. Lepr.*, 1948, 16 (2), 297-298.
- 358 SCHMAGER A., KLUDAS M. — Morphologische Studien an Corynebakterien mit dem Phasenkontrastmikroskop. *Zbl. Bakt., Parasitenkd. Infektionskrankh.*, 1951, 156 (1), 502-507.
- 359 STEMPEN H. — Demonstration of chromatine bodies of E. Coli and P. Vulgaris with the aid of the phase contrast microscope. *J. Bact.*, 1950, 60, 81-87.
- 360 TRACER W. — Observations with the phase contrast microscope on the malaria parasite Plasmodium Lophurae and on its extra-cellular development in vitro. *J. Bact.*, 1949, 35 (6), 23 ; *J. Roy. Micro. Soc.*, 1953, Sie III, 70 (2), 217.
- 361 TULASNE R. — Sur la cytologie des bactéries vivantes étudiées grâce au microscope à contraste de phase. *C.R. Soc. Biol.*, 1948, 143, 1.390-1.392.
- 362 TULASNE R. — Données nouvelles sur la cytologie des bactéries apportées par la microscopie de contraste. *C.R. Soc. Biol.*, 1948, 143, 1.392-1.394.
- 363 WALSCH E. — Phasenkontrastmikroskopische Darstellung der Veränderung von Gonokokken durch Penicillin. *Klin. Wschr.*, 1950, 28 (45/46), 776-779.

- 364 WINKLER A., KNOCH M., KONIG H. — Vergleichende Licht u. Elektronmikroskopuntersuchungen von Bakterien. *Naturwiss*, 1951, 38 (11), 241-247.
- 365 WINKLER A., KNOCH M., KONIG H. — Zur anwendung des Phasenkontrastverfahrens in der Bakteriologie. *Z. Naturforsch*, 1951, 6b (2), 72-76.
- 366 ZINSER H.-K. — Ein neuer Hinweis zur Diagnosestellung der *Trichomonas vaginalis*. *Zbl. Gynäk*, 1947, 69, 148-151.

